

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:
IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR MEDIANTE PCR EN
TIEMPO REAL DE DOS BACTERIAS DEL GÉNERO *Bacillus*, DE INTERÉS
AGROBIOTECNOLÓGICO.

AUTORA:
ANDREA MICHELLE CAMPAÑA VERDESOTO

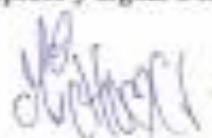
TUTORA:
VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS

Quito, Julio del 2018

Cesión de derechos de autor

Yo, Andrea Michelle Campaña Verdesoto con documento de identificación N° 1725488173, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: "IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL DE DOS BACTERIAS DEL GÉNERO *Bacillus*, DE INTERÉS AGROBIOTECNOLÓGICO", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Andrea Michelle Campaña Verdesoto

1725488173

Quito, Julio 2018

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, "IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL DE DOS BACTERIAS DEL GÉNERO *Bacillus*, DE INTERÉS AGROBIOTECNOLÓGICO", realizado por Andrea Michelle Campaña Verdesoto, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerado como trabajo final de titulación.



Viviana Pamela Chifusa Utreras

C.I: 1713168258

Quito, Julio 2018

Dedicatoria

A mis padres Edison y Nelly porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mi hermano, por su cariño y su apoyo para seguir adelante en este camino. A mi abuelita Carmelina Benavides que siempre con su amor, sus consejos y su apoyo me ayudó a seguir adelante a pesar de todo y yo sé que desde el cielo siempre me cuida y está muy feliz por mí.

Agradecimientos

En primer lugar agradecer a la Universidad Politécnica Salesiana por haberme formado con valores en el transcurso de mi vida universitaria, le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mis profesores de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, los cuales impartieron los mejores conocimientos para mi futuro profesional.

A mi tutora, MSc. Viviana Chiluisa-Utreras, por su dedicación, paciencia, tiempo y por haberme dado la oportunidad de trabajar junto a ella impartíendome sus conocimientos.

Al MSc. Daniel Acurio, por todo su apoyo y colaboración prestada en el transcurso del proyecto.

Al personal del Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, por permitirme hacer uso de sus instalaciones para realizar el proyecto y por su apoyo.

A todos mis amigos, especialmente a Michelle Tenorio por su gran amistad y apoyo en el transcurso del proyecto; a Ximena Galarza por su ayuda brindada en el inicio del proyecto y por su amistad, a Jossue Ramírez, Michelle Toapanta, Diego Mallitasig, Tatiana Arias, Andrea Flores y Belén Palacios gracias por esta etapa universitaria siempre llevaré conmigo los mejores recuerdos de su amistad.

Índice

| | |
|---|----|
| Introducción..... | 1 |
| Capítulo 1 | 4 |
| Marco Conceptual..... | 4 |
| 1.1. Género <i>Bacillus</i> | 4 |
| 1.1.1. Características Generales | 5 |
| 1.1.2. Taxonomía del género <i>Bacillus</i> | 5 |
| 1.1.2.1. Taxonomía..... | 5 |
| 1.1.2.2. <i>Bacillus licheniformis</i> | 7 |
| 1.1.2.3. <i>Bacillus megaterium</i> | 7 |
| 1.1.3. Importancia Agrobiotecnológica | 8 |
| 1.2. Identificación de <i>Bacillus</i> | 9 |
| 1.2.1. Métodos de identificación de <i>Bacillus</i> | 10 |
| 1.2.1.1. Tinción de Gram..... | 11 |
| 1.2.1.2. Tinción de Endospora | 11 |
| 1.3. Métodos Microbiológicos..... | 12 |
| 1.3.1 Curva de crecimiento | 12 |
| 1.3.2. Temperatura y pH..... | 13 |
| 1.2.3. Salinidad..... | 13 |
| 1.4. Métodos Moleculares | 13 |
| 1.4.1. Extracción del ADN | 14 |

| | |
|--|----|
| 1.4.2. Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 15 |
| 1.4.3. Amplificación mediante PCR en Tiempo Real | 17 |
| Capítulo 2 | 18 |
| Materiales y Métodos | 18 |
| 2.1. Reactivación de cepas bacterianas | 18 |
| 2.2. Resiembra de cepas | 18 |
| 2.3. Caracterización microbiológica de cepas | 19 |
| 2.4. Elaboración de curva de calibración | 20 |
| 2.5. Determinación de curvas de crecimiento | 21 |
| 2.6. Extracción de ácidos nucleicos | 22 |
| 2.6.1 Técnica de extracción y purificación de ADN con kit “High Pure Template | 22 |
| 2.7. Amplificación mediante PCR tiempo real | 23 |
| 2.8 Análisis Estadístico | 24 |
| 2.8.1 Análisis factorial de tratamientos | 24 |
| 2.8.2 Área bajo la curva | 25 |
| Capítulo 3 | 26 |
| Resultados y Discusión..... | 26 |
| 3.1. Caracterización microbiológica de cepas | 26 |
| 3.2. Curvas de crecimiento | 28 |
| 3.3. Análisis Estadístico | 31 |
| 3.4. Identificación molecular de <i>B. licheniformis</i> y <i>B. megaterium</i> mediante PCR en Tiempo Real | 39 |

| | |
|-----------------------|----|
| Conclusiones..... | 44 |
| Recomendaciones | 45 |
| Referencias | 46 |
| Anexos..... | 57 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Aspectos de las colonias y otras características | 6 |
| Tabla 2. Codificación de cepas bacterianas | 18 |
| Tabla 3. Tinción de Gram..... | 20 |
| Tabla 4. Preparación de estándares McFarland | 21 |
| Tabla 5. Primers específicos utilizados en la investigación | 24 |
| Tabla 6. Valores de medias, error experimental y (p) de análisis factorial para la variable “Temperatura” de las cepas BM y BL..... | 32 |
| Tabla 7. Valores de medias, error experimental y (p) de análisis factorial para la variable “pH” de las cepas BM y BL | 34 |
| Tabla 8. Valores de medias, error experimental y (p) de análisis factorial para la variable “Salinidad” de las cepas BM y BL | 35 |
| Tabla 9. Valores de medias, error experimental y (p) del análisis de área bajo la curva para las variables “Temperatura, pH y Salinidad” de las cepas BM y BL | 36 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Microscopia electrónica del género <i>Bacillus</i> | 4 |
| Figura 2. Fases de crecimiento bacteriano. | 12 |
| Figura 3. Ciclos de la PCR. | 16 |
| Figura 4. Morfología microscópica de <i>B. licheniformis</i> y <i>B. megaterium</i> | 27 |
| Figura 5. Curvas de crecimiento para la variable temperatura de las cepas BM y BL. | 29 |
| Figura 6. Curvas de crecimiento para la variable pH de las cepas BM y BL..... | 30 |
| Figura 7. Curvas de crecimiento para la variable salinidad de la cepa BM y BL.. | 31 |
| Figura 8. Curva de amplificación PCR en Tiempo Real con SYBR Green de la cepa BL. | 39 |
| Figura 9. Curva de amplificación PCR en Tiempo Real con SYBR Green de la cepa BM | 40 |

Índice de anexos

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Activación de cepas bacterianas | 57 |
| Anexo 2. Parámetros de programación del equipo LightCycler 2.0. | 58 |
| Anexo 3. Análisis factorial de Tukey 5% en datos de temperatura obtenida para BM y BL | 58 |
| Anexo 4. Análisis factorial de Tukey 5% en datos de pH obtenida para BM y BL..... | 60 |
| Anexo 5. Análisis factorial de Tukey 5% en datos de salinidad obtenida para BM y BL | 61 |
| Anexo 6. Área bajo la curva obtenida para BM y BL | 62 |

Resumen

Utilizando la técnica PCR en Tiempo Real, que es más sensible, específica y rápida que las técnicas convencionales, se ha logrado la detección molecular de dos bacterias del género *Bacillus* correspondientes a *B. licheniformis* y *B. megaterium* mediante el análisis de regiones específicas. Para alcanzar los objetivos, se realizaron análisis microbiológicos y estadísticos mediante las curvas de crecimiento con ANOVA y Tukey para determinar la diferencia significativa ($p < 0.001$) y evaluar el comportamiento microbiano frente a las variables planteadas. En el caso del análisis factorial para la variable “temperatura” no hubo una diferencia significativa entre cepas y tampoco con los valores fijados (28, 32, 37 °C), la variable “pH” si presentó una interacción con valores ($p < 0.0001$) entre cepas; la variable “salinidad” también presentó diferencia significativa entre cepas y con sus respectivas interacciones. En el análisis del área bajo la curva, la variable “temperatura” no mostró diferencia significativa, mientras que la variable “pH y salinidad” presentaron valores correspondientes a ($p < 0.0001$). Para la identificación molecular se determinó la presencia de las cepas de interés, mediante las curvas de amplificación, confirmando que la cepa BM corresponde a *Bacillus megaterium* mediante el análisis del gen *phaC*, así como también la cepa BL corresponde a *Bacillus licheniformis* al analizar el gen *lchAA*.

Palabras clave: *B. licheniformis*, *B. megaterium*, gen *lchAA*, gen *phaC*, PCR en Tiempo Real.

Abstract

Using the Real time PCR technique, which is more sensitive, specific and faster than conventional techniques, molecular detection of two bacteria of the genus *Bacillus* corresponding to *B. licheniformis* and *B. megaterium* has been achieved by analyzing specific regions. To reach the aims, microbiological and statistical analyzes were carried out using growth curves with ANOVA and Tukey to determine the significant difference ($p < 0.001$) and to evaluate the microbial behavior of the proposed variables. In the factorial analysis for the variable "temperature" there was no significant difference between the strains and neither with the fixed values (28, 32, 37 °C), the variable "pH" if it presented an interaction with values ($p < 0.0001$) between strains; the variable "salinity" also showed significant difference between strains and their respective interactions. In the analysis of the area under the curve, the variable "temperature" showed no significant difference, while the variable "pH and salinity" showed values corresponding to ($p < 0.0001$). For the molecular identification, the presence or absence of the strains of interest was determined by means of the amplification curve, confirming that the BM strain corresponds to *Bacillus megaterium* through the analysis of the *phaC* gene, as well as confirming that the BL strain corresponds to *Bacillus licheniformis* when analyzing the *lchAA* gene.

Keywords: *B. licheniformis*, *B. megaterium*, gen *lchAA*, gen *phaC*, Real-time PCR.

Introducción

El género *Bacillus* forma parte de la familia *Bacillaceae*, compuesto por bacilos grampositivos grandes, caracterizados por su capacidad de producir endosporas (Macedo, 2008). Este género incluye microorganismos aerobios estrictos y anaerobios facultativos, algunas especies son parásitas o patógenas para animales, principalmente insectos; crecen bien en los medios comunes, fermentan carbohidratos y descomponen proteínas (Jacome, 2012).

Presenta especies de interés para el ser humano; la mayoría son perjudiciales, como *Bacillus anthracis* que es el causante del ántrax; pero la gran mayoría son de importancia comercial, ya que se implementan en la elaboración de yogur como *Bacillus licheniformis*; otras en la producción de enzimas y antibióticos, también *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* son de interés agrícola, capaces de eliminar a otros microorganismos por los compuestos que sintetizan (Contreras, 2014).

Otra utilidad que se les atribuye a las bacterias del género *Bacillus* es en la agroindustria, por ejemplo *Bacillus thuringiensis*, presenta un cuerpo de cristal de proteína conocido como delta-endotoxina que se forma durante la esporulación, dándole la característica tóxica para larvas de insectos tales como Lepidópteros, Coleópteros y Dípteros (Sánchez-Yáñez, 2004) (Márquez, 2007).

Este género es de gran importancia a nivel mundial, no solo por los beneficios que genera al ser humano sino también por ser considerados de fácil manejo ya que pueden aislarse tanto de agua como del suelo. El aislamiento, la identificación de cepas y la selección por su capacidad de producir endosporas se practica en diversos laboratorios del mundo ya que son muy resistentes y pueden sobrevivir en condiciones extremadamente hostiles.

Las técnicas microbiológicas brindan información sobre la morfología de las colonias, la cual es fundamental en la identificación preliminar para la diferenciación de los microorganismos, la observación del fenotipo permite ubicarlo dentro del género *Bacillus* pero muchas veces no resulta suficiente para una identificación. Por esto, se acuden a técnicas más sofisticadas, como los ensayos moleculares basados en el análisis del genotipo de los microorganismos, que proporcionan información más específica al momento de hacer una amplificación (Sosa López & Pazos Álvarez, 2011).

Actualmente, la PCR en Tiempo Real es empleada en la detección de bacterias y también en su identificación; con ventajas de sensibilidad y alta especificidad, además permite trabajar con muestras a mayor escala (Chiluisa-Utreras & Echeverría, 2017), además, existen métodos moleculares para microorganismos que no permiten la aplicación de técnicas convencionales y que no permiten ser cultivados en medios artificiales (Palomino & Muñoz, 2014). La alta homología genética en determinados géneros bacterianos o reciente cambios en su asignación taxonómica, en ocasiones no permite la identificación a nivel de especie (o incluso de género) y en estos casos, puede recurrirse a genes diana específicos (Olmos, 2010).

La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo principal de identificar bacterias de interés agrobiotecnológico, que presentaron presunción bioquímica dentro del género *Bacillus*, se reactivaron dos cepas crioconservadas del Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede el Girón, se determinó la concentración inicial de las muestras mediante la técnica McFarland para proseguir con la comparación de curvas de crecimiento a diferentes rangos de pH, salinidad y temperatura, se determinó el tamaño, forma y posición de la endospora de las cepas de interés. Además, se realizó la extracción de ácidos nucleicos utilizando el kit “High Pure Template Preparation Kit”

de Roche[®], con la finalidad de determinar la presencia o ausencia de las dos cepas, mediante la curva de amplificación producto de la PCR en Tiempo Real.

Mediante ensayos cualitativos de PCR en tiempo real junto con técnicas clásicas que incluyen el uso de medios selectivos, pruebas bioquímicas y otras : por ejemplo, la morfología bacteriana y la posición de la endospora, se da la identificación de especies del género *Bacillus* y de esta manera la biotecnología moderna presenta ciertas ventajas, como los métodos alternativos con mayor rapidez, sensibilidad y eficiencia (Martínez-Blanch & Sánchez, 2010) (Milian & Rondón, 2014). Además, Larrea & Falconí (2015) reportan que cepas de *Bacillus* spp mediante una caracterización morfológica y tinción de gram lograron resultados positivos para determinar especies del género *Bacillus*, además, aplicando la metodología de tinción de endospora y la posición de la misma, se obtienen características esenciales de este género, o con el propósito de una mejor identificación y garantía de seguridad biológica permitir la aplicación de métodos moleculares.

Se planteó como hipótesis alternativa: la técnica de PCR en Tiempo Real mediante la amplificación de regiones específicas de *B. licheniformis* y *B. megaterium*, permite la identificación molecular confirmando la presunción microbiológica.

Capítulo 1

Marco Conceptual

1.1. Género *Bacillus*



Figura 1. Microscopia electrónica del género *Bacillus*.

Tomado de: (Blanch, 2017).

Los microorganismos del género *Bacillus* presentan un tamaño entre 4-10 μm , (BGP), aerobios estrictos, forman endosporas capaces de resistir condiciones extremas. Las especies de este género se clasifican en los subgrupos *B. polymyxa*, *B. subtilis* que incluye a *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* y *B. anthracis* (Bartram, 2003). Tienen la capacidad de ser metabólicamente muy diversos lo que les permite tener una colonización exitosa en el ambiente rizosférico. Entre algunos mecanismos se encuentran la solubilización de fosfato, la síntesis de fitohormonas como el ácido indol acético y la capacidad de controlar algunos hongos patógenos en la rizósfera (Calvo & Zúñiga, 2010).

1.1.1. Características Generales

Este género pertenece a la familia *Bacillaceae*, “Los miembros de este género se caracterizan por ser Gram positivos, de forma bacilar, catalasa positiva, aerobios estrictos o anaerobios facultativos y formadores de endosporas” (Tejera-Hernández, 2011). Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, algunos forman parte de la flora normal y otros son considerados contaminantes; otra variedad de especies se encuentra asociada a plantas, donde el crecimiento es favorable y permite el control biológico de patógenos. También, tienen implicaciones médicas por la producción de antibióticos como: polimixina y bacitracina, así como su aplicación industrial en la producción de solventes, enzimas, vitaminas, entre otros (Macedo, 2008).

1.1.2. Taxonomía del género *Bacillus*

1.1.2.1. Taxonomía

“El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por *Cohn* y comprende un grupo de especies filogenética y fenotípicamente heterogéneas. Incluye más de 100 especies y sus miembros se consideran ubicuos” (Tejera-Hernández, 2011). La clasificación se considera mediante las características que son: tinción Gram, forma de los bacilos y por último la posición de la endospora, véase en la Tabla 1.

Tabla 1.

Aspecto de las colonias y otras características

| Cepa | Aspecto de colonia | Otras características |
|-------------------------|-------------------------|---|
| <i>B. megaterium</i> | Grande, convexa | Bordes uniformes, húmeda |
| <i>B. licheniformis</i> | Colonia grande ampollar | Con el envejecimiento se torna opaca con superficie mate a rugosa |

Tomado de: (Bailey, 2009). Aspectos de colonias de *Bacillus* (Modificado por la autora).

Elaborado por: la autora, 2018.

El primer grupo está conformado por *Bacillus senso stricto* en el cual se incluye también a *Bacillus subtilis*. El segundo grupo, incluye especies de bacilos formadores de endosporas con forma redondeada, en el que se destacan las especies *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*. El tercer grupo, está formado por diez especies, entre ellas *B. macerans* y *B. polymyxa*, ubicadas en un nuevo género, que corresponde a *Paenibacillus*. Por último, el cuarto grupo está formado por especies que han sido reubicadas en dos nuevos géneros *Brevibacillus* y *Aneuribacillus* (Tejera-Hernández, 2011).

Los bacilos de interés, pertenecen al Grupo II dentro de la clasificación mencionada, entre ellos, *B. thuringiensis* Ber., *B. licheniformis* Ches., *B. megaterium* De Bary., *B. subtilis* y *B. mycoides* Flüg., dentro de este grupo el más representativo es *B. subtilis* conocido como agente de biocontrol, bacteria BGP, que produce una gran cantidad de lipopéptidos, metabolitos primarios o secundarios, con amplio espectro antibiótico (Yesid & Sánchez, 2012).

1.1.2.2. *Bacillus licheniformis*

B. licheniformis presenta características morfométricas como su forma irregular, con una superficie brillante de elevación plana y con un margen rizado. Se considera un bacilo grampositivo con un color beige (Sánchez, 2011). Formador de endosporas, anaerobio facultativo, este puede ser aislado de casi todas partes debido a sus endosporas resistentes que se difunden con facilidad en el aire (Espitia, 2012).

Es una bacteria que se encuentra comúnmente en el suelo y plumas de muchas aves. Las aves que tienden a permanecer en el suelo, en el aire y en el agua son portadoras de esta especie. Es un microorganismo del suelo con carácter apatógeno, asociado sobre todo con materiales de plantas y vegetales en la naturaleza. *B. licheniformis* se puede aislar de prácticamente cualquier lugar, ya que la resistencia de sus endosporas le confieren la capacidad de supervivencia (Espitia, 2012).

Además, es considerado un eficaz controlador biológico contra varios tipos de hongos, especialmente aquellos que causan enfermedades foliares y del tizón. “Presenta efecto antagónico frente a un amplio grupo de hongos fitopatógenos de los géneros *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Bipolaris*, *Aspergillus* y *Pyricularia*” (Reinoso Pozo & Vaillant Flores, 2007).

1.1.2.3. *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium ha fascinado a los microbiólogos desde que se describió por primera vez hace más de 100 años, debido a su fisiología, enzimas, productos útiles, y una amplia gama de hábitats ecológicos. Es capaz de esporular un ciclo simple de diferenciación

celular, que sirve como un sistema modelo para comprender la regulación genética durante el desarrollo temporal y morfológico de los microorganismos. Por otra parte, el gran tamaño de sus células vegetativas y las endosporas (la fuente de su nombre) lo hacen especialmente adecuado para el análisis morfológico; aunque se considera un organismo del suelo se encuentra en diversos ambientes como: arrozales, alimentos secos, agua de mar, sedimentos, peces, flora normal e incluso miel de abeja (Vary, 1994).

Bacillus megaterium pertenece al grupo de bacterias denominadas PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria), es decir que es capaz de solubilizar el fósforo mineral haciéndolo accesible a la planta, lo han descrito como agente de biocontrol capaz de ejercer un papel protector frente a determinados patógenos vegetales. Es importante en la industria de la biotecnología debido a su tamaño y facilidad de manejo, además de capacidades enzimáticas ayudan a producir penicilina sintética, modificando corticosteroides y varias deshidrogenasas de aminoácidos (Hayden, 2000).

1.1.3. Importancia Agrobiotecnológica

La Biotecnología a través de la historia puede ser descrita en diferentes términos, en ocasiones se menciona la relación del conocimiento del material genético y en otras ocasiones el aprovechamiento científico de microorganismos y enzimas. Mediante la agrobiotecnología se han propuesto alternativas con el fin de reemplazar los productos químicos. Una de estas son los biofertilizantes que mejoran el rendimiento de los cultivos favoreciendo el crecimiento de productos sanos, más resistentes a las plagas, saludables al consumo y fáciles de aplicar. “Además de poseer una serie de propiedades físicas, químicas y biológicas que son adecuadas para el mantenimiento de la fertilidad del suelo,

lo cual implica incremento en la productividad, esta es la llamada agricultura conservativa” (Corrales & Sánchez, 2014).

El género *Bacillus* constituye el grupo más utilizado en control biológico por ser el más numeroso en la microflora foliar, por su alto potencial de colonización y por su habilidad para utilizar diferentes formas de nutrientes bajo condiciones ambientales diversas. Esto hace necesario el conocimiento de la filosfera y la selección de los organismos más eficaces para su aplicación en la Biotecnología Agrícola (Tejera-Hernández, 2011).

Las bacterias del género *Bacillus* presentan un gran potencial como antagonistas principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida, es por esto que la identificación de estas especies puede permitir un futuro empleo en el área agrobiotecnológica ya que son capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos (Méndez-Úbeda, 2017).

1.2. Identificación de *Bacillus*

Este género se caracteriza por su forma bacilar, por ser Gram positivos, de catalasa positiva, aerobios estrictos y formadores de endosporas (Tejera-Hernández, 2011). Dentro de la práctica microbiológica se aplican técnicas fenotípicas que permiten una identificación. Sin embargo, muestran algunas limitaciones que se pueden observar de manera más evidente para algunos microorganismos y los métodos moleculares contribuyen a eludir algunas de estas (Olmos, 2010), permitiendo lograr el objetivo de una identificación con mayor sensibilidad y precisión (Bou, 2011).

1.2.1. Métodos de identificación de *Bacillus*

“Mediante diferentes técnicas de laboratorio se puede identificar microorganismos, por ejemplo la aplicación de tinción de Gram y pruebas bioquímicas que permiten determinar la localización taxonómica de microorganismos por su comportamiento metabólico” (Larrea Izurieta, 2015).

Los microorganismos pueden ser identificados por varios métodos clásicos que utilizan varios criterios de diferenciación que se describen en el Manual de Clasificación de Bergey, entre ellos caracteres fenotípicos: morfológicos y fisiológicos (Sosa López & Pazos Álvarez, 2011). Con la aplicación de pruebas bioquímicas, tinción de gram y el comportamiento metabólico, es posible determinar la localización taxonómica de especies de este género (Larrea Izurieta, 2015). En el caso del género *Bacillus* spp., la determinación fenotípica no es suficiente para una identificación, por este motivo la mayoría de investigadores recurren a ensayos moleculares para analizar las especies de interés a un nivel genotípico (Sosa López & Pazos Álvarez, 2011).

Al aplicar métodos microbiológicos tradicionales, generalmente se da el uso de cultivos específicos de acuerdo a la especie, dando un aislamiento adecuado, implica una confirmación de similitud mediante pruebas bioquímicas como: morfológicas y/o serológicas. En muchas ocasiones la obtención de resultados puede ser lenta y presentar baja sensibilidad (Palomino-Camargo, 2014).

Las técnicas moleculares en la actualidad presentan un alto impacto en la identificación de microorganismos debido a su especificidad y rapidez, presentando algunas alternativas moleculares como: Técnicas basadas en hibridación de ADN (RFLPs), técnicas basadas en PCR entre ellas RT-PCR (la amplificación de un segmento de ADN previamente formado a partir de ARN). RAPDs o polimorfismo de ADN amplificado, en el cual se

realiza una reacción de PCR con un solo iniciador el cual tiene un tamaño de ocho a doce bases, con secuencias que se pueden pegar aleatoriamente en el genoma (Rodríguez-Herrera, 2009).

1.2.1.1. Tinción de Gram

Para determinar las características de las bacterias que se pueden observar mediante tinción, se divide a las bacterias en dos grupos: el primer grupo con bacterias grampositivas que se tornan de color violeta-azulado, conserva el colorante principal tras el lavado con alcohol-acetona y el segundo grupo, con bacterias gramnegativas que presentan un tono rojizo tras la decoloración pierden el colorante principal, lo que hace necesario incorporar un reactivo de contraste para su observación. La coloración está basada en la diferencia de estructura de la pared bacteriana; en el caso de las cepas de interés al ser gram positivas, el reactivo se une al peptidoglicano de la pared y lo retiene, impidiendo la decoloración (Pérez & Mota, 2008).

1.2.1.2. Tinción de Endospora

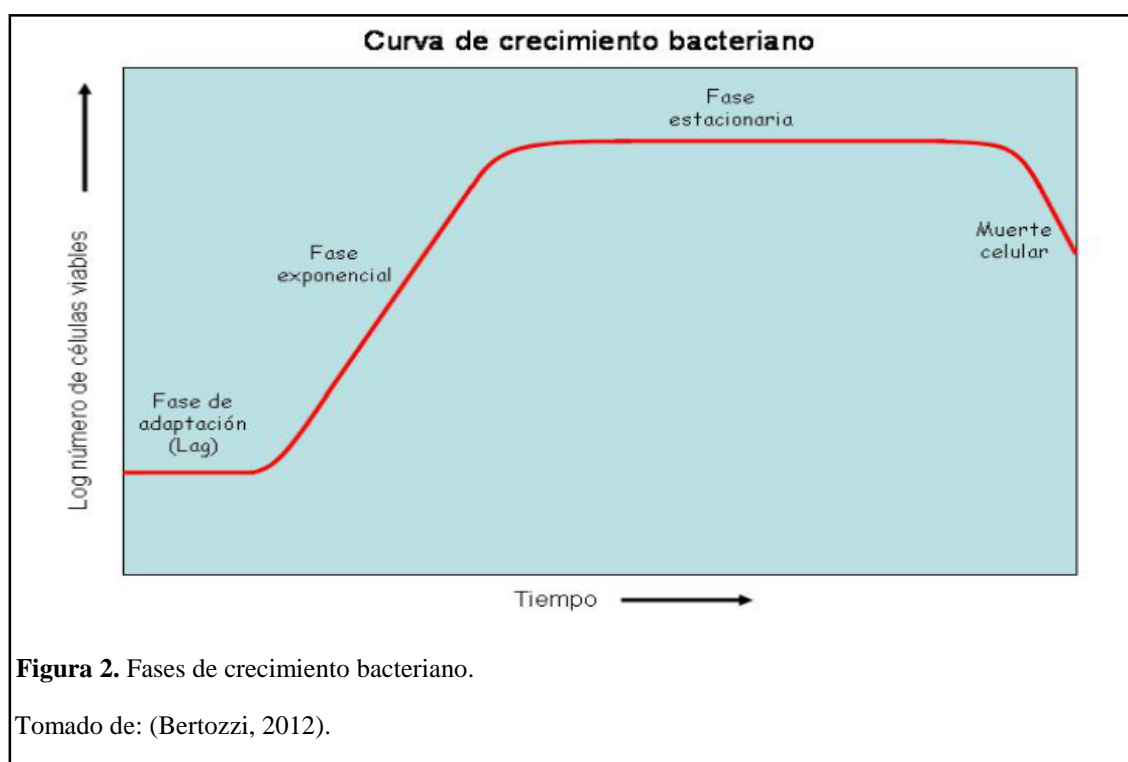
La técnica de Schaeffer–Fulton evidencia la presencia de endosporas en las cepas aisladas mediante tinción (Bradshaw, 1976). Los *Bacillus* formadores de endosporas se caracterizan por su posición en la célula madre antes de ser liberada. La endospora puede ser central, terminal o subterminal. Esta característica permite un fácil método de aislamiento de las bacterias esporuladas, calentando el material donde se supone que existen esporas, y las sobrevivientes germinan y crecen en el medio de cultivo adecuado. (Raisman, 2013).

1.3. Métodos Microbiológicos

Los métodos microbiológicos convencionales están basados en el cultivo y crecimiento bacteriano sobre un agar, pudiéndose caracterizar y analizar el comportamiento de la colonia después de 24 horas de incubación dependiendo de las condiciones en las que se encuentre (Solis, 2009).

1.3.1 Curva de crecimiento

El crecimiento bacteriano es considerado como el aumento del número de células, en donde una célula madre se divide en dos por fisión binaria y las nuevas células alcanzarán el mismo tamaño que la célula original. En medios de cultivos líquidos y en condiciones adecuadas, cuando un pequeño número de células procedentes de un cultivo puro son inoculadas, las células presentan una curva de crecimiento típica que puede descomponerse en cuatro fases como se observa en la Figura 2.



1.3.2. Temperatura y pH

Para muchas especies del género *Bacillus* la temperatura óptima de esporulación es muy similar a la óptima de crecimiento (Williams & Robertson, 1953), en un rango entre 32 y 37 °C. Muchos microorganismos crecen a velocidad óptima alrededor de un pH de 7, pero pueden crecer bien entre pH 5 y 8 (Cerutti, 2001).

1.2.3. Salinidad

Las especies del género *Bacillus* poseen por lo general entre 8 y 10 veces mayor concentración salina que la del agua de mar, además, producen compuestos tales como metabolitos y enzimas extracelulares con gran potencial industrial. Sin embargo, especies pertenecientes a este género en condiciones adversas presentan comportamientos diferentes, con la ventaja de una gran diversidad microbiana en ambientes extremos (Canales, Chávez-Hidalgo, & Zavaleta, 2014).

1.4. Métodos Moleculares

Las primeras técnicas de Biología Molecular, utilizadas desde los años 70 se basan en el mismo principio que las actuales, en la hibridación entre cadenas de ácidos nucleicos. Esta unión es de alta especificidad, superior a la unión Ag-Ac, pero carecen de sensibilidad, lo que las convirtió en poco útiles para la detección y se utilizan principalmente para la identificación de microorganismos (Stambouliau, 2010).

La PCR en Tiempo Real está presente como una herramienta para la detección e identificación de bacterias en una muestra, las nuevas tendencias en el uso de estas herramientas moleculares de diagnóstico proporcionan una detección rápida y sensible de patógenos disminuyendo el tiempo requerido para la obtención de los resultados (Chiluisa-Utreras & Echeverría, 2017). Existen métodos aplicables a la microscopía,

técnicas de identificación bioquímicas, pruebas de detección de antígenos y de anticuerpos e incluso técnicas de diagnóstico molecular para especies del género *Bacillus* en especial microorganismos patógenos (López & Castillo, 2003).

1.4.1. Extracción del ADN

El proceso de extracción consiste en uno de los primeros pasos para una identificación molecular. La aplicación de las diferentes técnicas empleadas en biología molecular para el análisis del genoma, depende en gran medida de la habilidad para extraer el ADN. Para lo cual se utilizan diversos métodos de extracción, dependiendo del tipo de tejido a emplear (Velasco, 2005).

En la actualidad, se dispone de múltiples metodologías de extracción, lo que permite que los biólogos moleculares puedan seleccionar la técnica que más se ajuste a sus necesidades. Para la diferenciación e identificación de *Bacillus*, la tinción gram nos permite determinar si una bacteria desconocida es gram positiva o negativa, para extraer el mismo, se utiliza agentes químicos y/o físicos que debiliten la pared y membrana de la célula. Por esta razón, es importante conocer el grupo al que pertenecen estas bacterias en caso de ser gram positiva o negativa, ya que al realizar la extracción de ADN genómico, debemos determinar el método apropiado y los agentes correctos para generar una ruptura efectiva (Sandoval, 2013).

Los pasos básicos involucrados en la extracción de ADN bacteriano para el género *Bacillus*, mediante kits comerciales involucra incorporar modificaciones para tener en cuenta las características especiales de las células. Las bacterias tienen pared celular y muchos kits no utilizan el método convencional de extracción orgánica requiriendo fenol/cloroformo y la precipitación con etanol, esto resulta útil ya que minimiza el daño

al DNA producido por los solventes orgánicos (Dhaliwal, 2016). En los últimos años el uso de kits comerciales para la extracción selectiva del ADN ha aumentado, ya que permite obtener una muestra de alta calidad en el menor tiempo posible, minimizando la contaminación externa con ADN o ARN exógeno (Alejos, 2014).

1.4.2. Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El uso de técnicas para la detección de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha tenido un gran impacto en el diagnóstico microbiológico. La mayoría de las técnicas en uso han sido diseñadas para la detección específica de un microorganismo y se aplica en cultivos difíciles de clasificar por técnicas fenotípicas.

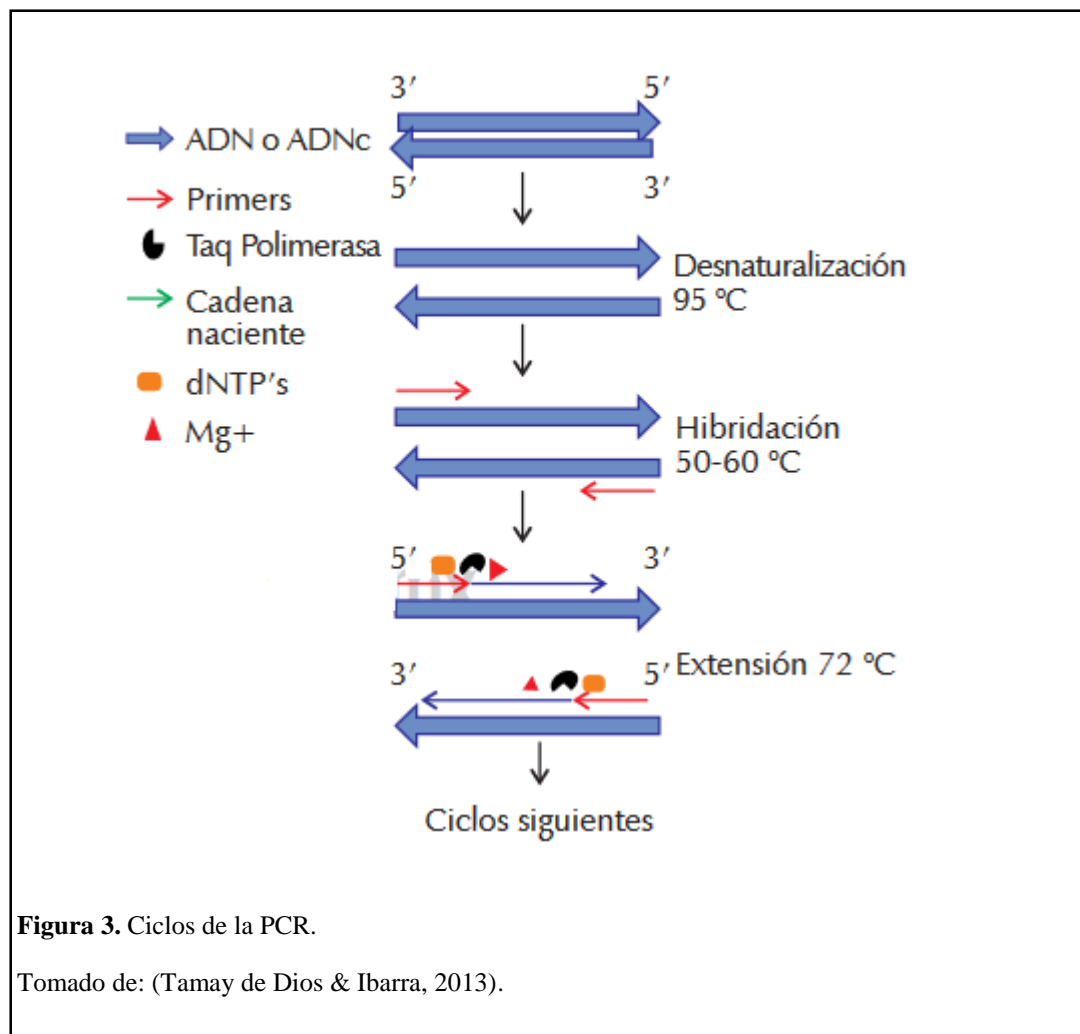
La PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión como se puede observar en la Figura 3.

En la etapa de desnaturalización, a una temperatura de 95 °C durante 30 segundos aproximadamente el ADN se separa, el tiempo estimado depende del protocolo a utilizar y de la especie de interés, al final de esta etapa se tendrá las cadenas separadas que servirán para el siguiente paso (Tamay de Dios & Ibarra, 2013).

En la etapa de hibridación, los primers se alinean al extremo 3' previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria, es importante que la temperatura de melting (T_m) sea la recomendable; ésta puede variar entre un rango de 50-60 °C, dependiendo del proceso a realizarse.

Por otra parte en la etapa de extensión, los primers comienzan su función catalítica mediante la acción de la Taq polimerasa, creando cadenas completas de ADN mientras va agregando dNTP's complementarios. El proceso se da en dirección 5' a 3'. La

temperatura óptima es de 72 °C, ya que a esa temperatura funciona la Taq polimerasa (Tamay de Dios & Ibarra, 2013).



Su variante moderna la PCR en Tiempo Real, es altamente discriminatoria y puede correlacionarse con técnicas de genotipificación permitiendo que la metodología altamente específica, sensible y eficiente de la PCR en tiempo real sea ampliamente utilizada para la delineación de las variedades genómicas del género *Bacillus* (Poggi M, 2009).

1.4.3. Amplificación mediante PCR en Tiempo Real

La PCR en Tiempo Real incorpora un sistema de detección de fluorescencia, basándose en la utilización de moléculas específicas denominadas fluoróforos. Este factor, permite monitorear en tiempo real el proceso de amplificación de los capilares evitando los procesos posteriores que implican una PCR convencional (Cultek, 2006).

En la PCR en Tiempo Real la cuantificación se da de acuerdo al valor de Crossing point (Cp), en el cual al inicio de la amplificación no se ve afectado por las variaciones, generando que los resultados sean reproducibles y más precisos.

La PCR en Tiempo Real es al momento el método más sensible para la detección y cuantificación los ácidos nucleicos, aun trabajando con cantidades muy pequeñas de ADN, la técnica genera alta eficiencia y sensibilidad (Tamay de Dios & Ibarra, 2013).

La identificación molecular de microorganismos del género *Bacillus*, permite confirmar la identidad de especies de interés, permitiendo el desarrollo de productos comerciales de calidad (García-Lazalde, Morales, Rodríguez-Herrera1, & Aguilar-González, 2011).

Para la identificación de muestras mediante curvas de amplificación, se suele realizar una curva adicional de desnaturalización “melting curve”; además, la reacción presenta una temperatura de 50 °C a 95 °C con un incremento paulatino de temperatura, verificando periódicamente la fluorescencia y al terminar el proceso, cuando el ADN se desnaturaliza genera un descenso en la fluorescencia provocando la disociación del SYBR Green I (Cultek, 2006).

Capítulo 2

Materiales y Métodos

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Campus el Girón con cepas bacterianas crioconservadas obtenidas del cepario del grupo de investigación Biotecnología Aplicada a los Recursos Naturales “BIOARN”, identificadas bioquímicamente dentro del género *Bacillus*, véase Tabla 2.

Tabla 2.

Codificación de cepas bacterianas.

| Muestra | Codificación BIOARN | Codificación Investigación |
|---------|---------------------|----------------------------|
| 1 | IB13 | BM |
| 2 | CT 1 | BL |

Elaborado por: la autora, 2018

2.1. Reactivación de cepas bacterianas

El material biológico se obtuvo del Criobank codificado como BM y BL, mediante la ayuda de un punzón estéril cada perla se siembra en cajas Petri de 25 mL con medio Agar nutriente (AN) a 30 ± 2 °C por 24 horas (Egas & Tinajero, 2016). Véase en el anexo 1a.

2.2. Resiembra de cepas

De las placas Petri con crecimiento bacteriano se realizó la siembra con un asa de metal, las muestras se suspendieron con 7 mL de medio Tryptic Soy Broth (TSB) a una

temperatura de 30 ± 2 °C y pH de 7 ± 0.2 en tubos de vidrio de 35 mL (Contreras, 2014) y con un tiempo de 24 horas (Egas & Tinajero, 2016). Véase anexo 1b.

2.3. Caracterización microbiológica de cepas

Se seleccionaron colonias blanquecinas, de bordes regulares que se sembraron en forma individual en Agar nutriente para determinar tamaño, forma bacilar, tinción de Gram positiva y la tinción de endosporas (Reyes Ramírez, 2011).

El tamaño y forma de las colonias bacterianas se determinaron mediante observación en microscopio óptico 100x con cámara (Moposita, 2017) , además a las cepas bacterianas aisladas se les realizó tinción Gram colocando un portaobjetos con una gota de agua destilada y una pequeña alícuota del cultivo bacteriano (BM y BL) con el asa de siembra estéril, se dejó secar fijando la muestra al fuego. Se cubrió con unas gotas de cristal violeta la placa durante 1 minuto, retirando el exceso de colorante con agua destilada. Se añadió lugol, solución de yodo-ioduro potásico, durante 1 minuto igualmente descartando el exceso con agua destilada. Se procedió a lavar la placa con alcohol-cetona formando un ángulo (el tiempo de decoloración es clave para un resultado correcto). Se cubrió con el colorante de contraste, safranina durante 1 minuto y finalmente se retiró el exceso de colorante con agua destilada, se dejó secar al ambiente, véase Tabla 3. Para la observación en lente de 100x se añadió una gota de aceite de inmersión (Covadonga Vázquez, 2010).

Tabla 3.

Tinción de Gram

| Solución | Tiempo de | Bacterias | Bacterias |
|------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| | Aplicación (min) | grampositivas | gramnegativas |
| Cristal Violeta | 1 | Violeta | Violeta |
| Lugol | 1 | Violeta | Violeta |
| Alcohol cetona | 1 | Violeta | Incolora |
| Safranina | 1 | Violeta | Rosada |

Tomado de: (Pírez & Mota, 2008), Soluciones de Tinción de Gram (Modificado por la autora).

Elaborado por: la autora, 2018.

Para la tinción de endosporas se tomó una muestra con ayuda del asa microbiológica estéril y se extendió en un portaobjetos, en el cual previamente se colocó una gota de ácido acético al 0.03 %, la muestra se fijó tras haber pasado varias veces el portaobjetos por la llama del mechero, se procedió a colocar unas gotas de solución verde brillante sobre la muestra la cual se calentó, hasta que la muestra emitió vapores, se colocó varias gotas de colorante sin dejar que se seque. El procedimiento se lo realizó por ocho minutos, una vez terminado este tiempo se lavó el exceso de colorante con agua destilada y finalmente se colocó una gota de safranina al 5 % por 1 min, lavando con agua destilada para descartar el exceso de colorante se procedió a la observación al microscopio óptico en 100x (Ñacato & Valencia, 2016).

2.4. Elaboración de curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se preparó los estándares McFarland con los valores establecidos en la Tabla 4. Estos valores de turbidez se tomaron como

referencia para una concentración inicial de cada muestra correspondiente a cada cepa (BM y BL) antes de realizar las curvas de crecimiento.

Tabla 4.

Preparación de estándares McFarland

| Número de Estándar | Curva de calibración | | |
|--------------------|---------------------------|-----------------------|--|
| | Ac. Sulfúrico (0.1%) (mL) | Cloruro de Bario (mL) | Equivalente en UFC/mL x10 ⁸ |
| 1 | 9.9 | 0.1 | 3 |
| 2 | 9.8 | 0.2 | 6 |
| 4 | 9.6 | 0.4 | 12 |
| 6 | 9.4 | 0.6 | 18 |
| 8 | 9.2 | 0.8 | 24 |

Tomado de: (Guerra & Reinoso, 2016). Preparación de estándares (Modificado por la autora).

Elaborado por: la autora, 2018.

2.5. Determinación de curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento a cada uno de los cultivos de bacterias (BM y BL) durante 72 horas; esto con el objetivo de evaluar la capacidad de crecimiento de los microorganismos después de haber estado en contacto con los analitos (NaCl, pH, temperatura). Se realizó 3 repeticiones con un total de 54 muestras.

Para cada proceso se colocó 95 mL de caldo nutritivo (TSB) con 5mL de inóculo (BM y BL) con un volumen final de 100 mL. Se determinaron las temperaturas de 28 °C, 32 °C y 37 °C. En el caso de determinar las curvas para pH se establecieron tres diferentes rangos uno ácido de 5, uno neutro de 7 y básico de 8. La salinidad se midió en tres porcentajes correspondientes a 2 %, 4 % y 6 % de NaCl. Todos los ensayos se midieron mediante espectrofotometría con la técnica Elisa a una absorbancia de 495 nm cada dos horas en un rango de horas laborables hasta llegar a un tiempo de 72 horas.

2.6. Extracción de ácidos nucleicos

2.6.1 Técnica de extracción y purificación de ADN con kit “High Pure Template Preparation Kit” (ROCHE)

Se colocó 200 µL de muestra (BM y BL) en un tubo eppendorf libre de nucleasas de 1.5 mL agregando 5 µL de lisozima e incubar 15 minutos a 37 °C. A continuación, añadir 200 µL de Buffer de Unión (Binding Buffer) y 40 µL de Proteinasa K, mezclar inmediatamente e incubar por 10 minutos a 70 °C.

Posterior a esto, se añadió 100 µL de etanol absoluto al 99 % y se mezcló muy bien. Después, se pipeteo el contenido de muestra en un Tubo con filtro (High Pure Spin Filter Tube) junto con un tubo colector, centrifugando por 1 minuto a 8000 xg. Al final lo que queda en el tubo con filtro se procedió a lavar.

Para los lavados se armó un nuevo tubo colector al cual se le añadió 500 µL de Buffer removedor de inhibidores (Inhibitor Removal Buffer) centrifugando por 1 minuto a 8000 xg. Posterior a esto, remover el tubo colector y armar uno nuevo, se añadió 500 µL de Buffer de lavado (Wash Buffer) centrifugando por 1 minuto a 8000 xg, este paso de lo realiza por duplicado.

Finalmente, para la elución del ADN se agregó 200 µL de Buffer de elución (Elution Buffer) calentado previamente a 70 °C, al tubo de filtrado, centrifugado por 1 minuto a 8000 x g. El ADN se conservó a -20 °C para su análisis posterior (Roche Diagnostics, 2008).

2.7. Amplificación mediante PCR tiempo real

Se empleó el protocolo establecido por Chiluisa- Utreras & Sánchez (2017), utilizando primers específicos descritos por (Madslien & Rønning, 2013) y (Pramoda & Ajeet, 2013), véase Tabla 5. Estos primers fueron previamente analizados mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information), en el cual se pudo determinar la similitud de nuestras secuencias con nuestras especies de interés.

El protocolo que se estableció fue de 5 µL para cada muestra (BM y BL) y sus controles. Se adicionó 10.2 µL de Agua grado Biología Molecular, 0.4 µL del Primer FW, 0.4 µL del Primer RW obtenidas de regiones específicas para cada cepa de *Bacillus* (Roche Diagnostics, 2017). Para la elaboración de la Master Mix se utilizó el Kit LightCycle® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I.

Los controles que se utilizó en la corrida de amplificación fueron: como control negativo agua grado PCR en el caso de las dos cepas y como control positivo *Bacillus licheniformis* ATCC®14580 y *Bacillus megaterium* ATCC®14581.

Se determinaron los siguientes parámetros para el equipo PCR LightCycler® 2.0. Carousel Based según el protocolo de LC FS DNA Master⁺PLUS HY-Pb, 96 react. LightCycler, que consiste en 35 ciclos basado en cuatro pasos: Desnaturalización: 95 °C, 5 minutos; Alineamiento: 58 °C, 10 segundos; Extensión: 72 °C, 7 segundos; Enfriado: 40 °C, 30 segundos, Véase anexo 2.

Tabla 5.

Primers específicos utilizados en la investigación.

| Secuencias usadas en la investigación | | |
|---|----------------------|-------------------------------|
| Región amplificar y nomenclatura de los primers | Secuencia (5'-3') | Temperatura de annealing (°C) |
| <i>Bacillus licheniformis</i> (lchAA) | | 58 |
| BLF | ACTGAAGCGATTCGCAAGTT | |
| BLR | TCGCTTCATATTGTGCGTTC | |
| <i>Bacillus megaterium</i> (phaC) | | 58 |
| BMF | CGTGCAAGAGTGGGAAAAT | |
| BMR | TCGCAATATGATCACGGCTA | |

Elaborado por: la autora, 2018.

2.8 Análisis Estadístico

2.8.1 Análisis factorial de tratamientos

Se evaluaron los resultados obtenidos por medio de las curvas de crecimiento con tres diferentes variables que permitieron realizar un análisis factorial de tratamientos, en este caso se escogió un diseño completamente al azar de 2x3; correspondiente a 2 cepas (BM y BL) y 3 niveles de un factor condicional (temperatura, pH y salinidad), que corresponde a 6 tratamientos.

Para el análisis de los datos se utilizó el sistema (InfoStat/L versión libre para Windows, InfoStat, Córdoba, 2008) (Di Rienzo, y otros, 2008). Los análisis de varianza se realizaron para determinar diferencias significativas entre las variables. La prueba de Tukey se usó para realizar comparaciones múltiples entre las medias. Los conteos de BM y BL se

transformaron a forma logarítmica (Log N), para garantizar las condiciones de normalidad en la curva de crecimiento (Guzmán Cedeño, y otros, 2015).

2.8.2 Área bajo la curva

La comparación de los resultados obtenidos se realizó mediante el test estadístico de ANOVA. Se calculó el área bajo la curva de crecimiento de la población bacteriana (ABCCP) acumulada en el tiempo (Berrueta & Giménez, 2014). Se compararon más de dos grupos entre sí, las diferencias entre éstos fueron determinadas con el test de Tukey. En todos los casos el límite de significancia fue fijado en 5 % ($p=0.05$) (Giacomino, y otros, 2012).

Para el análisis de los datos se utilizó también el sistema (InfoStat/L versión libre para Windows, InfoStat, Córdoba, 2008) (Di Rienzo, y otros, 2008). Se implementó un diseño en bloques completos al azar y las variables: temperatura, pH y salinidad se midieron cada dos horas aproximadamente.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Caracterización microbiológica de cepas

Los viales crioconservados correspondientes a BM y BL fueron re activados en medio Agar Nutriente (AN) a 30 ± 2 °C por 24 horas como menciona Egas & Tinajero (2016), las colonias correspondientes a BM fueron identificadas de forma macroscópica como colonias circulares, con borde entero y de elevación convexa, Anexo 1b. Según la metodología de Pérez & Mota (2008), la tinción de gram corresponde a bacilos grampositivos, corroborando los resultados obtenidos. En cuanto al tamaño se consideró que eran colonias grandes, porque al determinarlo de forma microscópica el valor corresponde a 560 μm . Para la tinción de endospora según el método de Nacato & Valencia (2016), se estableció endosporas muy visibles en posición terminal debido al gran tamaño de BM . En el caso de BL, presentó características macroscópicas como: colonias irregulares, borde ondulado y con elevación plana. Para determinar el tamaño se logró identificar colonias muy pequeñas y mediante observación microscópica se constató un tamaño de 116 μm . Para las tinciones se implementó la misma metodología señalada en BM obteniendo como resultado un bacilo grampositivo, con endosporas centrales como se puede observar en la Figura 4.

Según, UK Standards for Microbiology Investigations (2015), BM y BL pertenecen al grupo de *B. subtilis*, se indica que este grupo se encuentra estrechamente relacionado y que las células de estos organismos tienen menos de 1 μm de ancho, los esporangios no se hinchan y las endosporas son generalmente ovales, a veces, redondas o cilíndricas y son muy resistentes a las condiciones adversas, de acuerdo a las cepas estudiadas si corresponden macroscópica y microscópicamente a este grupo. Además, Sosa & Álvarez

(2011), reconocen a BM como un bacilo grampositivo con endosporas de gran tamaño presentes con frecuencia en el suelo; pudiendo causar daño tanto en animales como a los humanos. Así también reporta Vivas & Martínez (2008), que BL presenta características fisiológicas como bacilo grampositivo y con presencia de endosporas.

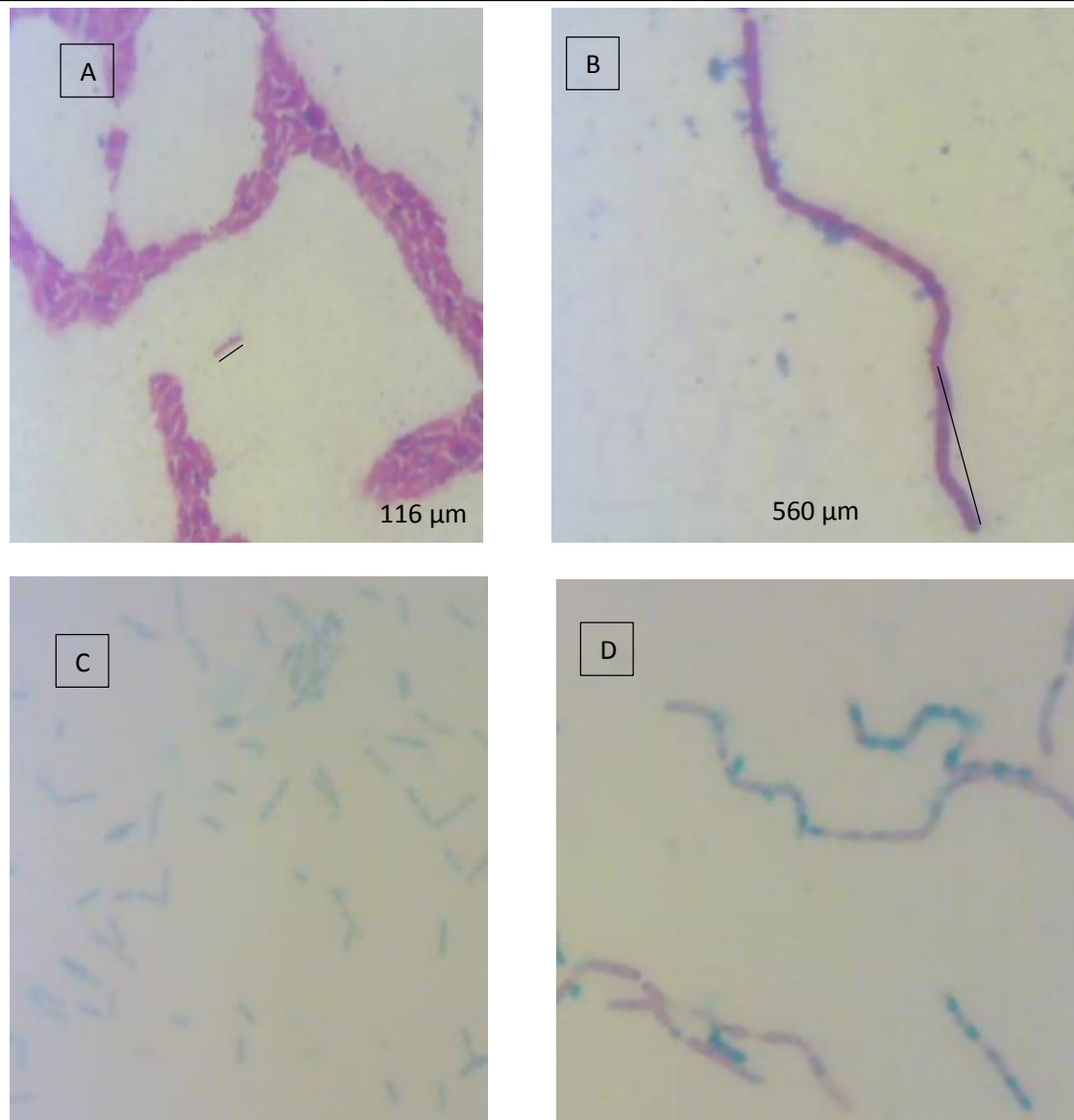


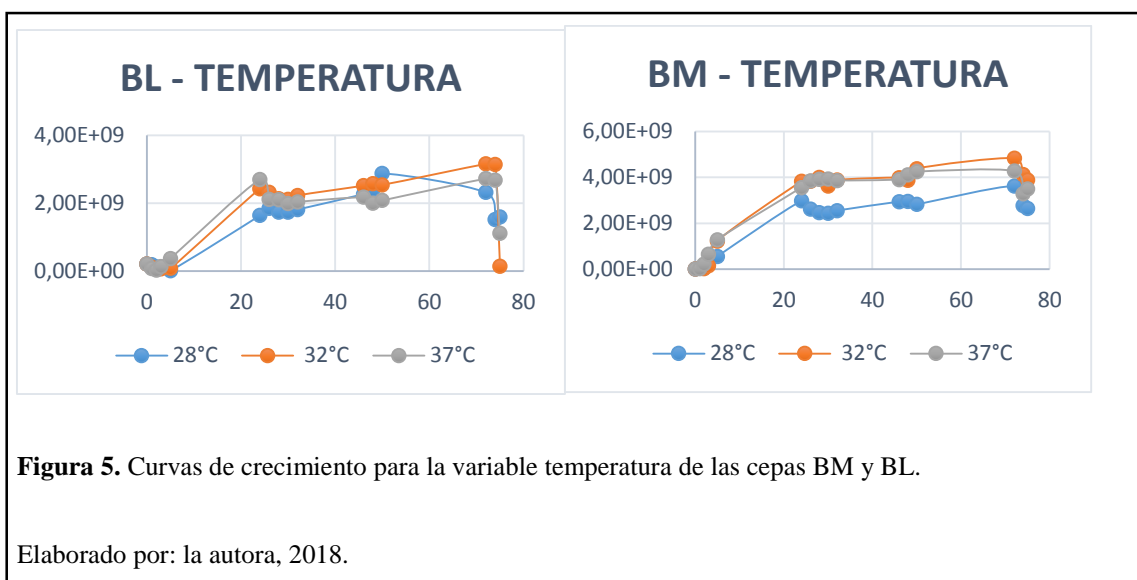
Figura 4. Morfología microscópica de *B. licheniformis* y *B. megaterium*. A) Tinción de gram y tamaño de cepa BL, B) Tinción de gram y tamaño de cepa BM, C) Endosporas de cepa BL, D) Endosporas de cepa BM.

Elaborado por: la autora, 2018.

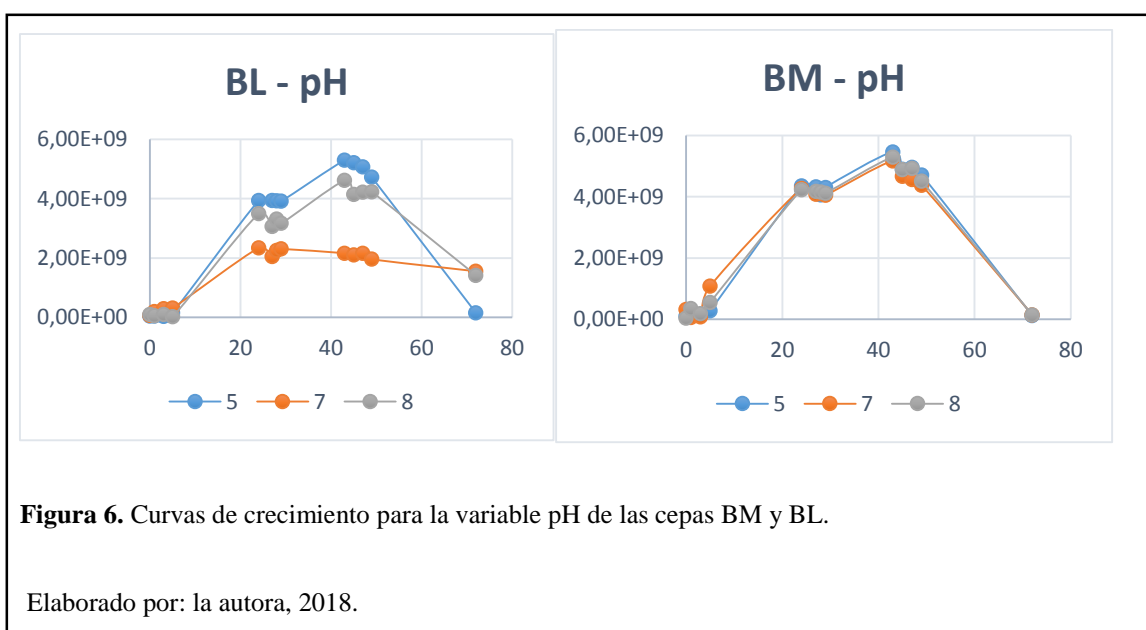
3.2. Curvas de crecimiento

Con la finalidad de estudiar el comportamiento de los microorganismos empleados, se efectuó la curva de crecimiento microbiano de cada cepa (BM y BL) por medio de ensayos espectrofotométricos y dos análisis estadísticos siguiendo la metodología antes mencionada con las tres variables (tratamientos) previamente citados. Una curva de crecimiento normal presenta cuatro fases: adaptación, una fase exponencial, latencia o estacionaria y finalmente la fase de muerte celular. La cepa BL para la variable de temperatura presentó una fase de adaptación entre las 0 y 10 horas, no se presentó mayor diferencia entre las tres temperaturas, mientras que la fase exponencial se dio a las 24 horas aproximadamente, siendo el rango de 37 °C el más alto; mientras que a partir de las 24 hasta las 48 horas se da una fase de latencia en donde el rango de 32 °C corresponde al valor más alto, en esta cepa se logró evidenciar la hora de muerte a las 72 horas aproximadamente notándose que a la temperatura de 32 °C fue la primera en decaer. Se puede decir que no existe una diferencia muy clara entre las temperaturas evidenciando que no están afectando directamente el crecimiento de esta cepa.

Por otra parte la cepa BM en cuanto a la temperatura tuvo una etapa de adaptación muy parecida a la cepa BL en las primeras horas, pero en la etapa exponencial se nota la diferencia que presenta la temperatura de 28 °C ya que se encuentra en los valores más bajos con relación a 32 y 37 °C lo que nos indica que no sería la temperatura óptima para su crecimiento pero sin embargo si logra crecer a esas condiciones como se muestra en la Figura 5. Según Tortoló-Cabañas & Bell-García (2015), *B. megaterium* presenta buenos resultados en 45 y 48 horas, cultivado en medio Tryptic Soy Broth (TSB) a diferentes tiempos de incubación.

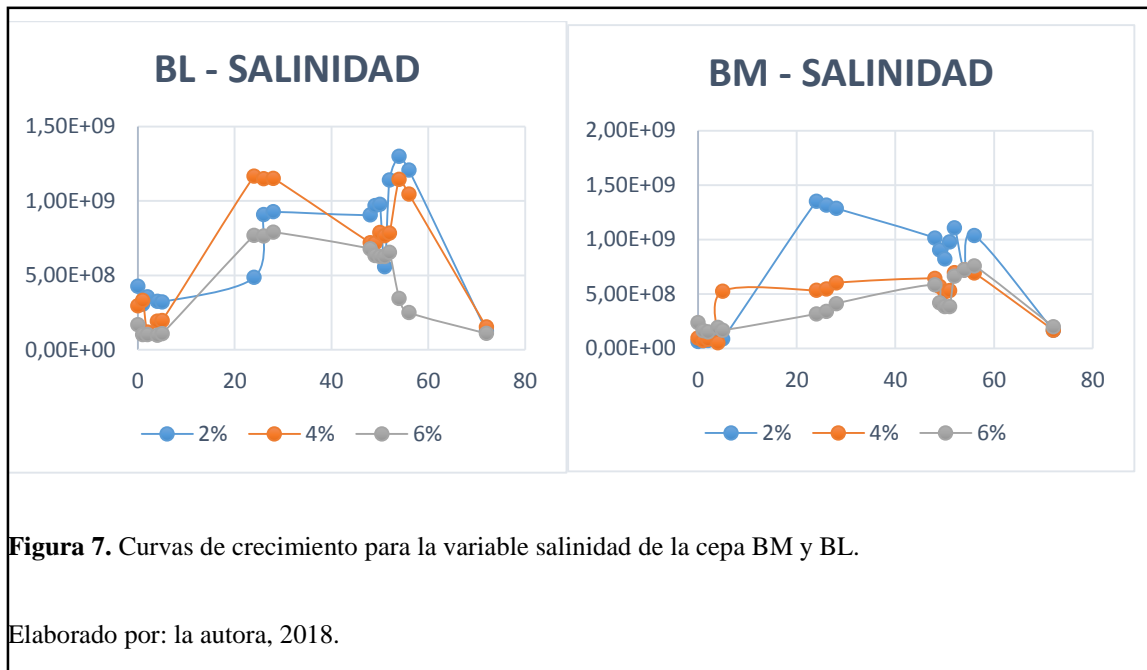


Como se observa en la Figura 6, al evaluar la variable pH se pudo evidenciar que la cepa BL presenta una etapa de adaptación entre la hora 0 y 5; la fase exponencial se da a partir de las 20 a las 48 horas notándose que a un pH de 5 se consigue el valor más alto seguido de la curva correspondiente a un pH de 8 y el valor de la curva para pH 7 presentó valores más bajos. La hora de muerte se dio a las 72 horas siendo la curva de pH 5 la primera en decaer. Mientras que la cepa BM no presentó mucha diferencia en cuanto a un rango de pH que favoreciera su crecimiento ya que en los tres casos se desarrolló de forma similar, notándose una fase exponencial de 24 a 48 horas y la fase de muerte a las 72 horas. En congruencia con otros estudios, Cascante (2013), concluyó que el crecimiento celular de la cepa BL ocurría básicamente durante las primeras 24 horas comprobando los resultados obtenidos para las dos cepas de estudio; indicando que el pH caía de 7.4 a 5 después de 42 horas de cultivo e incrementaba levemente a cerca de 6 después de 96 horas de cultivo.



Para evaluar el crecimiento con diferentes concentraciones de salinidad se pudo evidenciar como indica la Figura 7 que la cepa BL presentó una fase de adaptación entre la hora 0 y 5 sin presentar diferencia entre concentraciones, la fase exponencial se dio a partir de la hora 20 hasta la hora 60 aproximadamente. Se podría decir que la concentración de salinidad no influyó directamente en el crecimiento de BL ya que en los tres porcentajes de salinidad logró crecer sin mucha diferencia. Para la cepa BM la fase de adaptación se dio desde la hora 0 hasta la hora 10 aproximadamente siendo la curva más alta correspondiente al 4 % de salinidad, en la fase exponencial se logra evidenciar que a una concentración baja se da el mayor pico de crecimiento que corresponde al 2 % de salinidad. En la fase de latencia no presentan mucha diferencia entre las tres concentraciones pero sigue siendo la concentración más baja la que presenta mayor crecimiento. Se dio la fase de muerte a las 72 horas aproximadamente, y es notable que la cepa BM crece mejor en concentraciones bajas de salinidad ya que mientras aumenta la concentración su crecimiento es menor. Estudios realizados en plantas por Marulanda (2006), reportan que BM no es capaz de incrementar su crecimiento en 3M de NaCl pero

se mantiene a esta concentración, lo que sugiere que la tolera al menos durante 12 horas y esto representa una gran tolerancia frente a la variables de estudio, ya que se pudo evaluar el crecimiento de estas dos cepas y sus diferencias.



3.3. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis factorial con tratamientos (Temperatura, pH y salinidad) mediante la prueba de Tuckey con ($p < 0.05$) (Giacomino, y otros, 2012), este valor se tomó como referencia para determinar si existe o no diferencia significativa con horas clave (hora 0, 5, 24, 48, y 72), la cuales fueron determinadas de forma que se pudiera evaluar la gran cantidad de información obtenida. La variable temperatura presentó las siguientes características: a la hora 0 se dio una diferencia significativa entre cepas en cuanto al crecimiento, pero no se dio una interacción entre las tres temperaturas y tampoco se presentó una diferencia significativa para la interacción cepa*temperatura. En la hora 5 se mostró una diferencia entre las dos cepas y con respecto a los valores de 28 y 32 °C no

hay existió diferencia pero a 37 °C si se da un cambio. Para la hora 24 todavía influyó la temperatura en el crecimiento mostrando una diferencia significativa entre las dos cepas y entre los tres valores de temperatura. A las 48 y 72 horas se presentó diferencia significativa entre cepas y su diferencia en el crecimiento. Es importante mencionar que en ninguna hora se dio una interacción entre cepa*temperatura lo que nos indica que no se pudo establecer si la temperatura influye directamente en el crecimiento de estas cepas, véase Tabla 6. Montor-Antonio y otros (2013), expresan que la cepa BL presenta una extensa aplicación en diversos procesos industriales debido a sus amplios rangos de operación de temperatura (25-90 °C), insistiendo en que no existe un valor establecido ya que presentan crecimiento en casi todos los valores dentro del rango mencionado lo que corrobora los resultados obtenidos, véase anexo 3.

Tabla 6.

Valores de medias, error experimental y (p) de análisis factorial para la variable “Temperatura” de las cepas BM y BL.

| TEMPERATURA | | | |
|-------------|---------------|---------------|---------|
| HORA 0 | | | |
| | BM | BL | p-valor |
| CEPA | 7.2 ± 0.10 a | 8.32 ± 0.10 b | <0.0001 |
| HORA 5 | | | |
| CEPA | 8.86±0.08 b | 7.85±0.08 a | <0.0001 |
| T° | 28° | 7.94±0.10 a | 0.0001 |
| | 32° | 8.29±0.10 a | |
| | 37° | 8.84±0.10 b | |
| HORA 24 | | | |
| CEPA | 9.46 ± 0.02 b | 9.30 ± 0.02 a | 0.0001 |
| T° | 28° | 9.32 ± 0.02 a | 0.0039 |
| | 32° | 9.36 ± 0.02 a | |
| | 37° | 9.46 ± 0.02 b | |
| HORA 48 | | | |
| CEPA | 9.55 ± 0.03 b | 9.36 ± 0.03 a | 0.0005 |
| HORA 72 | | | |
| CEPA | 9.62 ± 0.03 b | 9.42 ± 0.03 a | 0.0013 |

Elaborado por: la autora, 2018.

Para el caso de la variable pH los resultados se muestran en la Tabla 7, para las cepas BM y BL en la hora 0 no se identificó una diferencia significativa en cuanto a su crecimiento inicial, a partir de la hora 0 hasta la 5 no se da una diferencia entre cepas, y tampoco en la interacción cepa*pH. Entre las 24 y 48 horas es cuando se presentaron las mayores interacciones entre cepas, pH y cepa*pH, véase anexo 4. A las 24 horas los valores de pH 5 y 8 denotan que se encontraban en un mismo grupo y el pH de 7 pertenece a un grupo diferente en el análisis estadístico planteado. En cuanto a la interacción cepa*pH se nota claramente que la cepa BM se agrupa en un mismo grupo, observándose que no existió diferencia entre sus valores de pH en el crecimiento y en el caso de la cepa BL se notó la diferencia que existe entre los valores de pH 7 y 8 ya que son los que muestran mayor diferencia. Para las 48 horas se da la diferencia entre cepas con los valores asignados en la tabla 7, el pH y también la interacción cepa*pH mostraron que entre las dos cepas, la cepa BM es la que tiene mayor crecimiento y al analizar los tres rangos de pH se evidenció que los valores de 5 y 8 se encontraban agrupados mientras que a un pH neutro se da un menor crecimiento por eso se encuentra en un grupo estadístico diferente.

Es importante recalcar que la cepa BM a partir de la Hora 5 se mantuvo en su crecimiento siendo superior a la cepa BL. Según, Pérez y otros (1998) el crecimiento de las células microbianas para el caso de *Bacillus* está muy influenciado por el pH, y en muchos casos al igual que para la temperatura, el pH establecido para el crecimiento específico de una cepa difiere del pH óptimo en la síntesis de enzimas por la misma cepa y Keay (1970), reporta un valor óptimo de actividad proteasa-serina a partir de *Bacillus licheniformis* a un pH de 10.5.

Tabla 7.

Valores de medias, error experimental y (p) de análisis factorial para la variable “pH” de las cepas BM y BL.

| pH | | | |
|---------|---------------|----------------|---------|
| HORA 0 | | | |
| | BM | BL | p-valor |
| CEPA | 7.80 ± 0.23 a | 7.54 ± 0.23 a | 0.4278 |
| HORA 5 | | | |
| CEPA | 8.63 ± 0.18 b | 7.79 ± 0.18 a | 0.0066 |
| HORA 24 | | | |
| CEPA | 9.63 ± 0.01 b | 9.50 ± 0.01 a | <0.0001 |
| pH | 5 | 9.62 ± 0.01 b | <0.0001 |
| | 7 | 9.50 ± 0.01 a | |
| | 8 | 9.58 ± 0.01 b | |
| CEPA*pH | BM | BL | |
| 5 | 9.64 ± 0.02 c | 9.59 ± 0.02 bc | <0.0001 |
| 7 | 9.63 ± 0.02 c | 9.37 ± 0.02 a | |
| 8 | 9.63 ± 0.02 c | 9.54 ± 0.02 b | |
| HORA 48 | | | |
| CEPA | 9.68 ± 0.01 b | 9.55 ± 0.01 a | <0.0001 |
| pH | 5 | 9.70 ± 0.01 b | <0.0001 |
| | 7 | 9.49 ± 0.01 a | |
| | 8 | 9.66 ± 0.01 b | |
| CEPA*pH | BM | BL | |
| 5 | 9.70 ± 0.02 b | 9.70 ± 0.02 b | <0.0001 |
| 7 | 9.66 ± 0.02 b | 9.33 ± 0.02 a | |
| 8 | 9.69 ± 0.02 b | 9.63 ± 0.02 b | |
| HORA 72 | | | |
| CEPA | 8.01 ± 0.19 a | 8.64 ± 0.19 b | 0.0421 |

Elaborado por: la autora, 2018.

La salinidad por otra parte presentó los siguientes resultados que se presentan en la Tabla 8, las dos cepas no presentaron diferencia significativa en cuanto a su crecimiento a ninguna hora. La única interacción que se dio fue a las 24 horas mediante la interacción cepa*salinidad en la cual se formaron tres grupos distinguibles ratificando que la cepa BM presentó mayor crecimiento a concentraciones bajas de salinidad, y la cepa BL logró crecer en todos los porcentajes de NaCl establecidos, véase anexo 5.

Tabla 8.

Valores de medias, error experimental y (p) de análisis factorial para la variable “Salinidad” de las cepas BM y BL.

| SALINIDAD | | | |
|----------------|----------------|----------------|---------|
| HORA 0 | | | |
| | BM | BL | p-valor |
| CEPA | 7.77 ± 0.20 a | 8.77 ± 0.20 a | 0.1042 |
| HORA 5 | | | |
| CEPA | 8.25 ± 0.11 a | 8.16 ± 0.11 a | 0.5971 |
| HORA 24 | | | |
| CEPA | 8.79 ± 0.05 a | 8.85 ± 0.05 a | 0.4142 |
| SALINIDAD | 2 | 8.86 ± 0.05 a | 0.0932 |
| | 4 | 8.90 ± 0.05 a | |
| | 6 | 8.69 ± 0.05 a | |
| CEPA*SALINIDAD | BM | BL | |
| 2 | 9.13 ± 0.09 b | 8.60 ± 0.09 a | <0.0001 |
| 4 | 8.73 ± 0.09 ab | 9.07 ± 0.09 b | |
| 6 | 8.50 ± 0.09 a | 8.88 ± 0.09 ab | |
| HORA 48 | | | |
| CEPA | 8.85 ± 0.04 a | 8.87 ± 0.04 a | 0.7488 |
| HORA 72 | | | |
| CEPA | 8.23 ± 0.08 a | 8.05 ± 0.08 a | 0.1210 |

Elaborado por: la autora, 2018.

El segundo análisis correspondiente al área bajo la curva arrojó resultados que se pueden observar en la Tabla 9. Para la variable “Temperatura” existió una diferencia significativa entre cepas y en cuanto a los tres valores establecidos (28, 32, 37 °C) no se encontró diferencia alguna ya que los tres se asignaron en un mismo grupo, es decir la temperatura en este caso no influyó directamente en el crecimiento de estas cepas. En cuanto a la variable “pH” si existió una diferencia significativa entre cepas siendo la cepa BL la que tuvo mayor crecimiento y en cuanto a los valores específicos (5, 7, 8 pH) es notable que a un pH de 8 esta tuvo mejores resultados, además se dio una diferencia significativa para la interacción cepa*pH en la cual se formaron claramente dos grupos entre las dos cepas

de los cuales solo BM a un pH de 8 tuvo diferencia alguna. Para la variable “Salinidad” se dio una diferencia significativa entre cepas notándose que la cepa BL es la que presenta mayor crecimiento y para los valores específicos (2, 4, 6 %) si existió diferencia significativa entre las tres concentraciones de salinidad en el caso de las dos cepas. También existió diferencia para la interacción cepa*salinidad siendo la cepa BM la que presentó una diferencia entre las dos a una concentración del 6 % de NaCl, véase anexo 6.

Tabla 9.

Valores de medias, error experimental y (p) del análisis de área bajo la curva para las variables “Temperatura, pH y Salinidad” de las cepas BM y BL.

| | BM | BL | p-valor |
|-----------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| CEPA | 9107.05 ± 25.85 b | 8848.98 ± 25.85 a | <0.0001 |
| TEMPERATURA | 28 | 8915.83 ± 31.65 a | 0.08483 |
| | 32 | 8996.55 ± 31.65 a | |
| | 37 | 8915.83 ± 31.65 a | |
| CEPA | 6802.81 ± 23.79 a | 6962.28 ± 23.79 b | 0.0005 |
| pH | 5 | 6982.16 ± 29.13 b | 0.0001 |
| | 7 | 6947.37 ± 29.13 b | |
| | 8 | 6718.10 ± 29.13 a | |
| CEPA*pH | BM | BL | |
| 5 | 7005.48 ± 41.20 b | 6958.84 ± 41.20 b | <0.0001 |
| 7 | 6996.01 ± 41.20 b | 6898.73 ± 41.20 b | |
| 8 | 6406.95 ± 41.20 a | 7029.25 ± 41.20 b | |
| CEPA | 5499.35 ± 10.19 a | 5549.12 ± 10.19 b | 0.0048 |
| SALINIDAD | 2 | 5594.52 ± 12.47 c | <0.0001 |
| | 4 | 5523.86 ± 12.47 b | |
| | 6 | 5454.31 ± 12.47 a | |
| CEPA*SALINIDAD | BM | BL | |
| 2 | 5620.08 ± 17.64 d | 5568.95 ± 17.64 cd | 0.0012 |
| 4 | 5477.64 ± 17.64 ab | 5570.09 ± 17.64 cd | |
| 6 | 5400.31 ± 17.64 a | 5508.31 ± 17.64 bc | |

Elaborado por: la autora, 2018.

“El crecimiento microbiano radica en un complejo número de reacciones equilibradas que determinan su metabolismo. Estas reacciones catabólicas o anabólicas están sujetas a variables ambientales que influyen en las condiciones y tasas de crecimiento celular” (Castañeda & Sánchez, 2016, pág. 59). Los factores de temperatura y pH son muy influyentes en el crecimiento de una cepa, Según Vanrova & Chaloupka (1990), reportan una particularidad de *B. megaterium* cuando crece a una temperatura de 28 °C ya que tiene la capacidad de producir proteasas y Frost (1993), reporta una temperatura óptima para el crecimiento de esta misma cepa a 38 °C con un pH óptimo de 8. Estos resultados son concluyentes con los obtenidos a una temperatura de 37 °C ya que fue considerada la óptima frente a los otros valores establecidos, además el análisis estadístico no arrojó diferencia significativa en cuanto a los valores asignados de temperatura, y el valor de pH coincide con lo obtenido frente a los reportados en el trabajo antes mencionado.

Bacillus es un género asociado a pH neutros, sin embargo, esta capacidad de adaptación a pH bajo ya ha sido reportada por Pal (1998), ya que a pesar que los valores bajos de pH no son los valores óptimos de crecimiento para este género, estudios previos con valores de pH bajos en suelo han demostrado la presencia activa de especies de *Bacillus* (Calvo & Zúñiga, 2010), como se pudo corroborar en este estudio el pH más bajo tuvo buen crecimiento lo que confirma lo reportado por dichos autores. Por otra parte, Keay & Wildi (1970) reportan a la cepa *B. licheniformis* con un pH de 8.5 presentando mejores resultados de crecimiento con características favorables para la producción de enzimas y mejoramiento de plantas (Pérez, y otros, 1998).

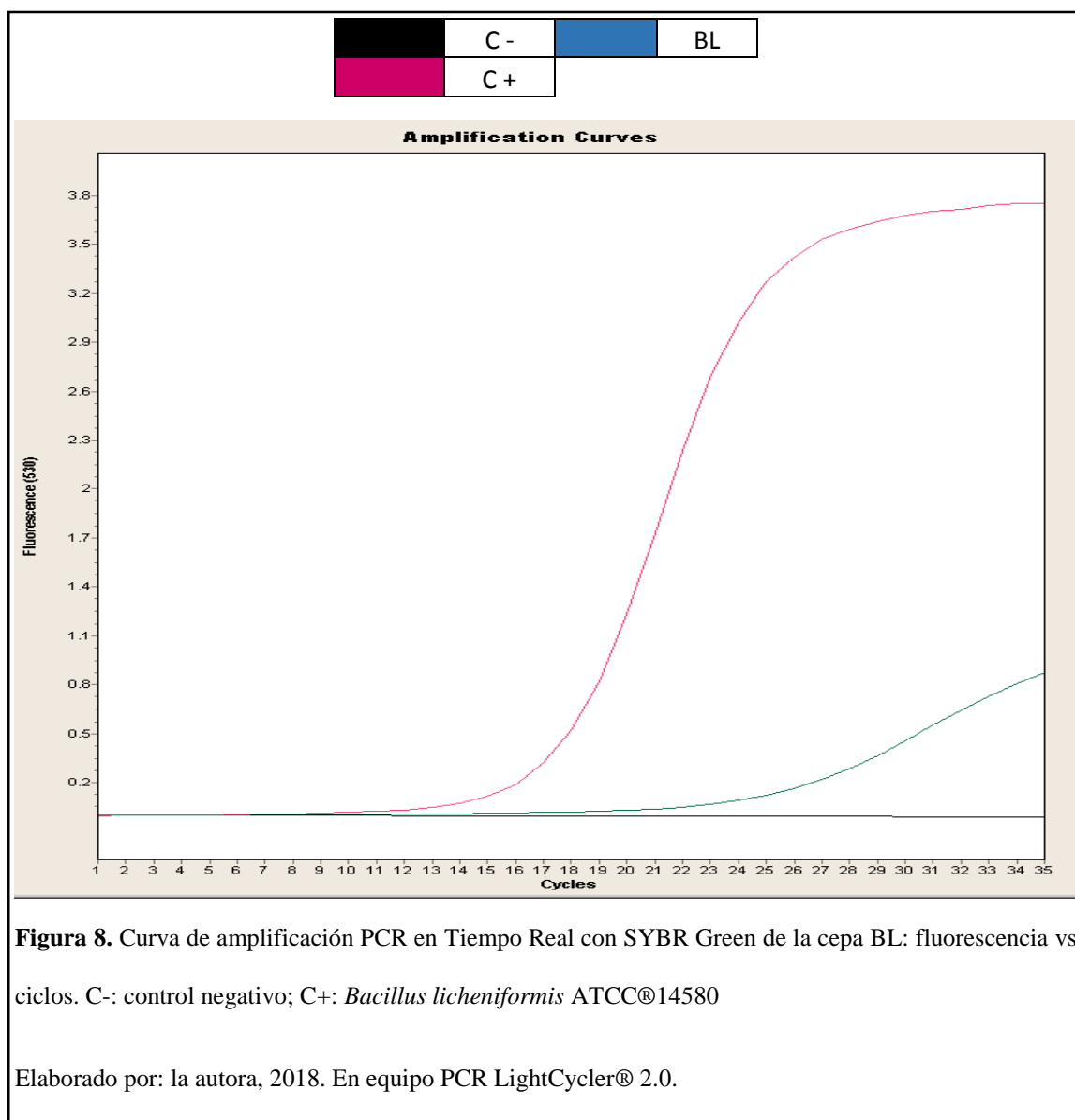
Como el estudio evaluó tres diferentes rangos de pH se observó que la curva para *B. licheniformis* a pH 5 fue la que presentó mayor crecimiento pero también a pH de 8 se pudo lograr obtener buenos resultados. La cepa BL mostró un crecimiento más bajo frente a los otros valores establecidos de pH lo que no se reporta por parte de Corrales & Sánchez

(2014), ya que indican que *B. licheniformis* actúa mejor a pH neutro (Hornbæk, Jakobsen, Dynesen, & Nielsen, 2004) y que alcanza su fase estacionaria a las 24 horas, y en nuestro caso la cepa BL presentó una fase estacionaria a partir de las 24 horas confirmando lo establecido por Birrer & otros (1994).

Al determinar la resistencia de las cepa BM y BL a diferentes concentraciones de salinidad y evaluar su crecimiento y su comportamiento, es importante acotar que la cepa BM frente a la cepa BL siempre presentó un mayor crecimiento y esto pudo deberse a que según Marulanda (2006) la cepa BM presenta un potencial para resistir el estrés osmótico ambiental, es decir tolera concentraciones de NaCl al menos durante 12 horas, lo que le da la característica de gran tolerancia a la salinidad y en este caso tomaron como referencia la salinidad del mar que corresponde a 0.6 M. Además, se llega a la conclusión de que es tolerable a la salinidad debido a la producción de *prolina* ya que se incrementa a medida que se incrementa la concentración de NaCl.

Por su parte la cepa BL a pesar de presentar menor crecimiento en las tres concentraciones establecidas de NaCl, logró indicar que también es tolerante frente esta característica según, Torres (2004) reporta que *B. licheniformis* es un microorganismo resistente a solventes orgánicos y diversos estudios han demostrado que los estímulos de estrés, los solventes orgánicos y concentraciones elevadas de sal, inducen alteraciones fisiológicas en el crecimiento y cambios morfológicos. Concluyendo que el estrés salino inducen en *B. licheniformis* alteraciones morfológicas, las cuales podrían estar asociadas a un mecanismo general de resistencia lo que se pudo comprobar en el comportamiento de esta cepa.

3.4. Identificación molecular de *B. licheniformis* y *B. megaterium* mediante PCR en Tiempo Real



La cepa BM y BL fueron sometidas a estudio mediante la técnica PCR en Tiempo Real bajo las condiciones antes mencionadas en el capítulo de materiales y métodos. Para el ensayo se utilizaron capilares de 20 μ L y los cebadores descritos en la tabla 5. En la Figura 8 se muestran los productos de amplificación de la cepa BL mientras transcurren los ciclos de la PCR. La cepa BL presentó una hibridación con los primers codificados como BLF y BLR utilizados por (Madslien & Rønning, 2013) que permitieron la amplificación del

gen *lchAA* región que ha demostrado ser capaz de identificar de forma taxonómica a esta cepa ya que el operón de Lichenysin (*lchA*) es responsable de la síntesis de lichenysin en *B. licheniformis*. Por lo que se puede confirmar la presencia de la cepa BL correspondiente a *Bacillus licheniformis*.

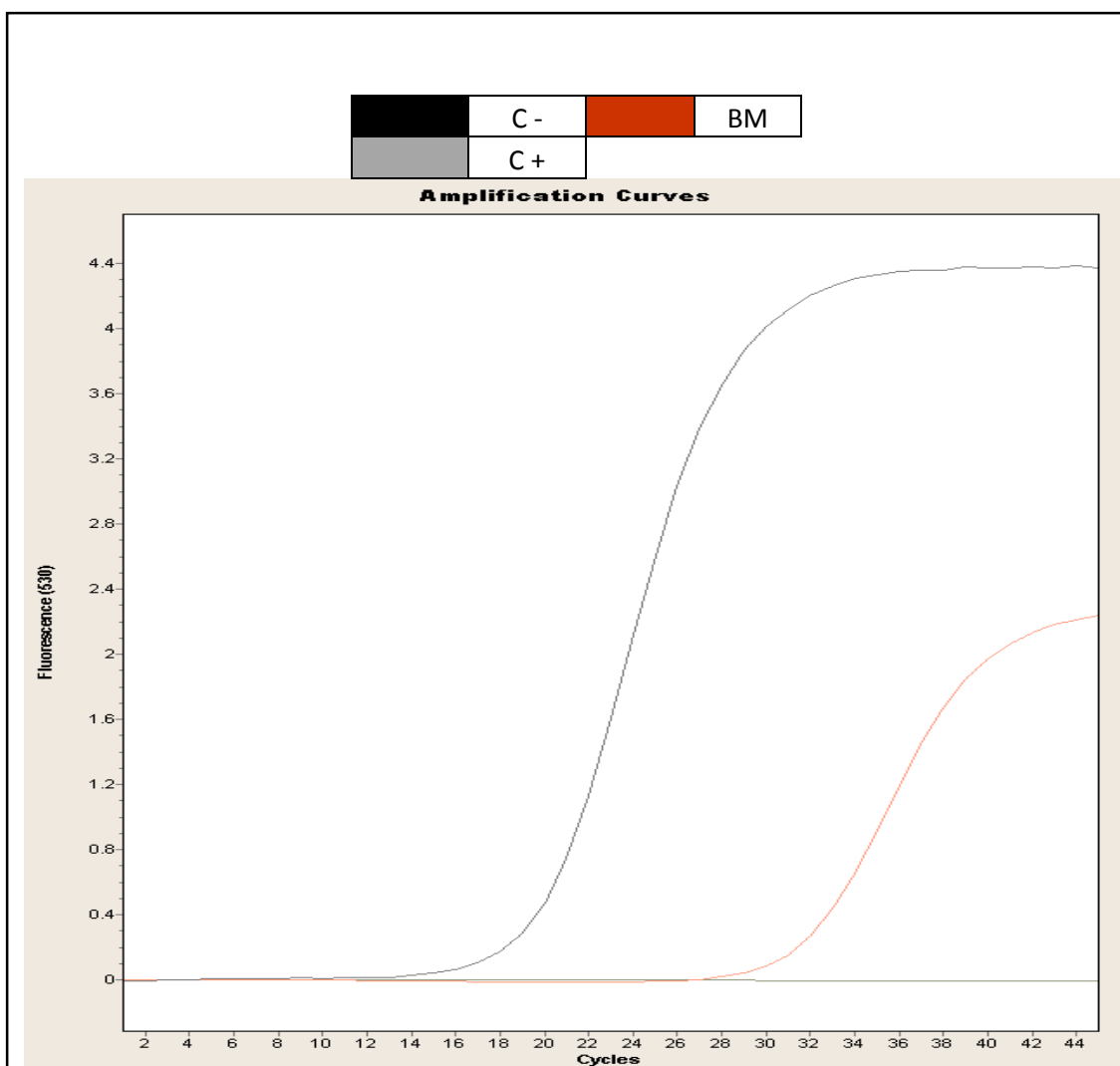


Figura 9. Curva de amplificación PCR en Tiempo Real con SYBR Green de la cepa BM: fluorescencia vs ciclos. C-: control negativo; C+: *Bacillus megaterium* ATCC®14581

Elaborado por: la autora, 2018. En equipo PCR LightCycler® 2.0.

En la Figura 9 se observan los resultados obtenidos en la amplificación de la cepa BM en la cual se da la hibridación del ADN molde mediante los cebadores específicos utilizados por (Pramoda & Ajeet, 2013) presentados previamente en la tabla 5, estos permitieron la amplificación del gen *phaC* cuyas secuencias sirven para reconocer regiones únicas presentes, que fueron utilizadas para diseñar los cebadores indicando la singularidad de las secuencias de *phaC* en la identificación de *B. megaterium*. Con estos resultados se puede confirmar la presencia de la cepa BM como *B. megaterium*.

En base a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa: la técnica de PCR en Tiempo Real mediante la amplificación de regiones específicas de *B. licheniformis* y *B. megaterium*, permite la identificación molecular confirmando la presunción microbiológica.

El diagnóstico molecular resulta una alternativa conveniente en diversos campos de investigación, ya que su alto grado de eficiencia, detecta microorganismos patógenos de interés agrícola. Por ejemplo los métodos moleculares con potencial en el área microbiológica se han ido desarrollando y diversificando. La PCR es considerada como el método de diagnóstico molecular más accesible y recientemente una variaciones de este, la PCR en Tiempo Real, presenta ventajas adicionales entre las que se destaca una mayor velocidad en la obtención de resultados. Sin embargo, los equipos y reactivos resultan más costosos que aquellos empleados en métodos tradicionales de identificación, pero esta desventaja es característica en la mayoría de las técnicas moleculares descritas (Palomino-Camargo, 2014).

Existen estudios como el de Konzl (1997), que presenta la PCR en Tiempo Real como técnica para la caracterización molecular de genes de la bacitracina producido por *B. licheniformis* ATCC 10716 a través de un sistema complejo multienzimático. Dado que los miembros del género bacteriano gram positivo *Bacillus* son bien conocidos por su

potencial para secretar un número de enzimas de interés no fue sorprendente que las cepas de estudio correspondientes a BL y BM aisladas mediante cebadores específicos resultaron ser miembros de este taxón. *B. licheniformis* es una bacteria que se puede aislar de varias fuentes: como el suelo, el agua y en los desperdicios (Waldeck, Daum, Bisping, & Meinhardt, 2006). Para este estudio en el caso de la cepa BL se partió del gen *lchAA* para su identificación molecular, existe un estudio que ha demostrado que la cepa *B. licheniformis* ATCC14580 y algunas otras cepas de *B. licheniformis* albergan el gen *lchAA* (Nieminen, y otros, 2007). Según Madslein & Ronning (2013), la presencia de genes de lichenisina sintetasa en un gran número de cepas de *B. licheniformis* es hasta donde se sabe desconocida, pero en el estudio realizado por los autores antes mencionados se detectó el gen *lchAA* en 53 cepas de *B. licheniformis* examinadas, lo que indica que la mayoría de las cepas fueron capaces de producir lichenisina, confiriéndole esa característica de pertenecer a este grupo para una identificación molecular más específica, llegando a la conclusión de que la distribución de las secuencias del gen *lchAA* en el estudio reflejaron la relación genética entre las cepas en lugar de la capacidad de síntesis de la lichenisina.

Por su parte, *Bacillus megaterium* ha logrado ser reconocido como modelo experimental y microorganismo biotecnológicamente importante ya que recientemente se dio un aumento en la descripción de nuevas cepas de *B. megaterium* y especies relacionadas que han sido aisladas de diversos hábitats, ya que ofrecen varias ventajas en la producción de proteínas recombinantes (Tortoló-Cabañas & Bell-García, 2015). Su valor ecológico y económico ha sido establecido en las últimas dos décadas, ya que varias cepas nuevas de esta especie presentan un inmenso potencial en la industria al ser aisladas de varios ecosistemas. La presencia de *B. megaterium* en el suelo ha sido implicada en la degradación de herbicidas e insecticidas, por esto su importancia agrobiotecnológica. Por

lo tanto, su identificación es de gran interés para futuros procesos implicados con esta cepa. Existen varios estudios implicados en la identificación de la cepa BM, este estudio se centró específicamente en el gen *phaC*. Algunos autores como Pramoda & Ajeet (2013) proponen utilizar el gen *polihidroxialcanoato sintasa C* de *B. megaterium* para el diseño de cebadores que amplifican la región *phaC* para su identificación. Por otra parte Chen (1991) informa que muchas especies de *Bacillus* producen *pha* y desde entonces el gen para la síntesis de *pha* ha sido clonado a partir de *B. megaterium*. En su estudio presenta cebadores basados en la secuencia de *pha sintasa* que le permitieron la identificación de otros *Bacillus* productores de *pha* similar al presente en *B. megaterium* utilizando la técnica de PCR. El *pha* producido por estas diferentes especies de *Bacillus* fue caracterizado y cuantificado después de la producción fermentativa (Shamala, Chandrashekar, Vijayendra, & Kshama, 2003).

Al igual que *B. megaterium* y *B. licheniformis*, otros miembros del género *Bacillus* “son organismos industriales atractivos con capacidades conocidas para producir enzimas, proteínas recombinantes, antibióticos, nucleótidos de purina, proteínas insecticidas, vitaminas, biopolímeros de azúcares y biofertilizantes” (Pramoda & Ajeet, 2013). Por esta razón fueron el motivo de estudio y pues la importancia de su identificación molecular contribuirá para su posterior uso en procesos agrobiotecnológicos.

Conclusiones

Las concentraciones bacterianas obtenidas mediante la técnica McFarland permitieron generar las curvas de crecimiento para establecer las horas clave en el análisis, confirmando que las características analizadas: forma, tamaño, tinción de gram y posición de endospora corresponden a especies pertenecientes a la familia *Bacillaceae*.

Los modelos estadísticos ANOVA y Tukey permitieron el análisis particionado de los componentes para aprobar la hipótesis y con el análisis del área bajo la curva se concluye que los datos obtenidos frente a las variables planteadas presentan un alto grado de precisión.

La técnica molecular de PCR en Tiempo Real mediante las curvas de amplificación, permitió determinar la presencia de la cepa BM que corresponde a *Bacillus megaterium* mediante el análisis de la región *phaC*; así también se pudo corroborar que la cepa BL corresponde a *Bacillus licheniformis* al analizar la región *lchAA*.

Recomendaciones

Investigar las interacciones que presentan *B. megaterium* y *B. licheniformis* como agentes de biocontrol frente a determinados patógenos vegetales, además por los mecanismos de resistencia sistémica inducida que poseen frente a bacterias y hongos patógenos, virus sistémicos y nematodos de la raíz de algunas plantas.

Utilizar el método de espectrofotometría para análisis microbiológicos genera buenos resultados para dar seguimiento al crecimiento bacteriano y corroborar los datos obtenidos optimizando tiempo y con una mayor especificidad, en comparación a la técnica de recuento de placa.

Evaluar una alternativa en la producción de proteínas recombinantes (PR) utilizando como hospedero bacteriano a *Bacillus megaterium* con énfasis en las oportunidades que la ingeniería metabólica ofrece para mejorar la producción de PR y las estrategias de cultivo.

Referencias

- Alejos, L. (2014). Extracción y Purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, 16.
- Bailey, S. (2009). *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Bartram, J. (2003). *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health*. Londers (Reino Unido): IWA Publishing. Obtenido de http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf
- Berrueta, C., & Giménez, G. (2014). Componentes de resistencia a *Xanthomonas vesicatoria* raza T2 en genotipos de tomate en condiciones de invernadero y cámara de crecimiento. *Agrociencia Uruguay*, 27.
- Bertozzi, E. (2012). *Selección de microorganismo indígenas mediante pruebas in vitro, para mejorar el estado sanitario y la performance de crecimiento durante la crianza intenisa de cerdos*. Esperanza.
- Birrer, G. A., Cromwick, A.-M., & Gross, R. A. (1994). γ -Poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945A: physiological and biochemical studies. . *Int. J. Biol. Macromol*, 265–275. .
- Blanch, A. (27 de Julio de 2017). *Nutrición Animal*. Recuperado el 20 de Diciembre de 2017, de <https://nutricionanimal.info/genero-bacillus-componente-activo-en-microbiota-intestinal/>
- Bou, G. (2011). *Bacterial identification methods in the microbiology laboratory*. Madrid-España.

- Bradshaw, L. J. (1976). Microbiología de Laboratorio. *El Manual Moderno*, 33.
Recuperado el 20 de Agosto de 2017
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). *CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS de Bacillus spp. AISLADAS DE LA RIZOSFERA DE PAPA (Solanum tuberosum)*. Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú.
- Canales, P. E., Chávez-Hidalgo, E. L., & Zavaleta, A. I. (2014). Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 150-157.
- Cascante Alízar, J. R. (2013). Fermentación de bacterias del género *Bacillus* en altas concentraciones de oxígeno. *UPCommons*, 28.
- Castañeda, E., & Sánchez, L. C. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *NOVA*, 59.
- Cerutti, N. (2001). *Determinación de la temperatura óptima de esporulación de cuatro cepas de Clostridium perfringens Tipo A*.
- Chen, G., Konig, K., & Lafferty, R. (1991). Occurrence of poly- D- 3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiology Letters. FEMS Microbiology*, 173-176.
- Chiluisa-Utreras, V., & Echeverría, A. (22 de Julio de 2017). Identificación y cuantificación de *Salmonella* sp. y ADNr 16S bacteriano mediante PCR en tiempo real en muestras de alimentos. *BIONATURA*, 1-6. doi:10.21931/RB/2017.02.01.5

- Chiluisa-Utreras, V., Sánchez, C., & Maldonado, M. E. (2017). Molecular Identification of the Antibiotic Producing Bacteria, *Burkholderia cepacia* Complex, by Means of Real-Time PCR. *International Journal of Bioprocess & Biotechnological Advancements*, 10.
- Contreras, R. (06 de Julio de 2014). *La Guía Biología*. Recuperado el 08 de Septiembre de 2017, de <https://biologia.laguia2000.com/microbiologia/el-genero-bacillus>
- Corrales, L. C., & Sánchez, L. C. (2014). *Bacillus: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador del fosfato*. Bogotá-Colombia: NOVA.
- Covadonga Vázquez, A. M. (2010). Técnicas básicas de Microbiología Observación de bacterias. *Reduca-Serie Microbiología*, 22.
- Cultek. (2006). *Soluciones QPCR - Protocolo y Técnicas*.
- Dhaliwal, A. (2016). *Extracción y purificación de ADN*. New Jersey.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2008). *Manual del usuario*. Córdoba, Argentina: Editorial Brujas.
- Egas, C., & Tinajero, M. (2016). Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales del Ecuador. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Espitia, M. A. (2012). *Aislamiento de la bacteria (B. licheniformis)*. Cordoba.
- Frost, G., & Moss, D. (1993). Production of Enzymes by Fermentation. *Biotechnology*, 7, 333.
- , V., Morales, D., Rodríguez-Herrera1, R., & Aguilar-González, C. (2011). IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO FILOGENÉTICO DE

MICROORGANISMOS BENÉFICOS (*Bacillus* Y *Trichoderma*) EMPLEADOS EN LA AGRICULTURA. *Coordinación de Estudios de Postgrado e Investigación y la Facultad de Ciencias Químicas*, 3.

Giacomino, M., Notaro, U., Cerra, M., Gumiy, D., Stiefel, S., Baroni, E., . . . Formentini, E. (2012). ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DE CEFALEXINA SOBRE *Escherichia coli* EN SUERO Y ORINA DE CANINO. *FAVE - Ciencias Veterinarias*, 21.

Guerra, S., & Reinoso, G. (2016). *Evaluación in vitro de la capacidad bacteriana para remover plomo en aguas residuales sintéticas*. Quito.

Guzmán Cedeño, Á. M., Zambrano Pazmiño, D. E., Rivera Fernández, R. D., Rondón, A. J., Laurencio Silva, M., & Pérez Quintana, M. (Marzo de 2015). Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de manabí-ecuador con actividad celulolítica. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 26.

Hayden, R. (2000). *Missouri S&T Biology*. Recuperado el 01 de Agosto de 2017, de http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2000/Bacillus_megaterium.html

Hornbæk, T., Jakobsen, M., Dynesalejosen, J., & Nielsen, A. (2004). Global transcription profiles and intracellular pH regulation measured in *Bacillus licheniformis* upon external pH upshifts. *Microbiology*, 467-474.

Jacome, I. (02 de Junio de 2012). *Bacterias Productoras de Neurotoxinas*. Recuperado el 03 de Noviembre de 2017, de <http://4alcbacterneurotoxinas.blogspot.com/2012/06/bacterias-productoras-de-neurotoxinas.html>

- Keay, L., & Wildi, B. S. (1970). Alkaline proteases. En *Proteases of the genus Bacillus* (Vol. 12, pág. 213).
- Konzl, D., Klensl, A., Schbrgendorfer, K., & Marahiell, M. A. (1997). The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chemistry & Biology*, 935-936.
- Larrea Izurieta, I. (2015). *Aislamiento y caracterización de cepas de Bacillus spp. con actividad contra Tetranychus urticae Koch en cultivos comerciales de rosas*. Quito-Ecuador: Revista Colombiana de Biotecnología .
- Larrea, I., & Falconí, C. (2015). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*.
- López, J., & Castillo, F. (2003). Técnicas de identificación. En *Microbiología aplicada al paciente crítico* (pág. 29). Recuperado el 09 de Septiembre de 2017
- Macedo, M. (2008). *Temas de Bacteriología y Virología Medica*.
- Madslie, E., & Rønning, H. (2013). Lichenysin is produced by most *Bacillus licheniformis*. *Journal of Applied Microbiology*, 1071.
- Márquez, F. (2007). *Aislamiento y Taxonomía de bacterias del género Bacillus recolectadas en suelos de un bosque de Pinus radiata y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo*. Valdivia-Chile.
- Martínez-Blanch, J. F., & Sánchez, G. (2010). Evaluation of a Real-Time PCR Assay for the Detection and Quantification of *Bacillus cereus* Group Spores in Food. *Journal of Food Protection* , 1480.

- Marulanda, A. (2006). *Estudios de los mecanismos implicados en la resistencia de las plantas a estreses osmóticos inducidos por microorganismos autóctonos promotores del crecimiento vegetal (hongos micorrícicos arbusculares y bacterias)*. Granada.
- Méndez-Úbeda, J. (2017). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE Bacillus subtilis Y EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO IN VITRO FRENTE HONGOS FITOPATÓGENOS*. Managua-Nicaragua: Revista Científica Nexo.
- Milian, G., & Rondón, A. (2014). Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus* spp. en diferentes ecosistemas con fines probióticos. Su utilización en animales. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*.
- Montor-Antonio, J. J., Olvera-Carranza, C., Reyes-Duarte, D., Sachman-Ruiz, B., & Ramírez-Coutiño, L. (2013). Biochemical characterization of AmiJ33 an amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated of sugarcane soils at the Papaloapan region. *Revista Electrónica Nova Scientia*, 6(12), 42.
- Moposita, F. (2017). *IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, MICROALGAS Y HONGOS TERMÓFILOS DE LA FUENTE GEOTERMAL “CHACHIMBIRO” MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES*. Recuperado el 14 de Septiembre de 2017
- Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A., Ali- Vehmas, T., Seppälä, A., . . . Salkinoja- Salonen, M. (2007). Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Vet Microbiology*, 329-339.
- Ñacato, C., & Valencia, M. F. (2016). *Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de alternaria spp en Brassica oleracea var. Itálica*.

- Olmos, F. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 5-9. Recuperado el 02 de Agosto de 2017
- Pal, S. (1998). Interactions o fan acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerante crops. . *Plant and Soil*, 169-177.
- Palomino, C., & Muñoz, Y. (2014). Molecular techniques for detection and identification of pathogens in food: advantages and limitations. *Revista Peruana de Medicina*. Recuperado el 08 de Septiembre de 2017, de <http://www.rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/93/1932>
- Palomino-Camargo, C. (2014). *Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones*. Caracas-Venezuela.
- Pérez, M., Milián, G., Alfonso, G., González, R., Piad, R., & Ascunce del Sol, G. (1998). Isolation and characterization of strains of *Bacillus* spp. Production of proteolytic enzymes for the production of protein hydrolysates. *Revista Avanzada Científica*, I(3).
- Pírez, M., & Mota, M. (2008). Morfología y Estructura Bacteriana. En *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (pág. 26).
- Poggi M, H. (2009). *Universal or broad-range polymerase chain reaction (PCR): A contribution to the detection and identification of bacteria and fungi in clinical practice*. Santiago de Chile: Revista Médica de Chile.
- Pramoda, K., & Ajeet, K. (2013). Rapid Identification of Polyhydroxyalkanoate Accumulating Members of *Bacillales* Using Internal Primers for *phaC* Gene of *Bacillus megaterium*. *ISRN Bacteriology*, 2.

Raisman, J. (2013). *HIPERTEXTOS DEL ÁREA DE LA BIOLOGÍA*. Recuperado el 14 de Septiembre de 2017, de Endósporas y formas de persistencia: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro7.htm>

Reinoso Pozo, Y., & Vaillant Flores, D. (Marzo de 2007). SELECCIÓN DE CEPAS DE *Bacillus* Y OTROS GÉNEROS RELACIONADOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS FITOPATÓGENOS. *Fitosanidad*, 11(1), 35-39.

Reyes Ramírez, A. (02 de Abril de 2011). SELECCIÓN DE *Bacillus* SPP. CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA *in vitro* CONTRA *Macrophomina phaseolina* (TASSI) GOID. EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO. *Fitosanidad*, 117-121.

Roche Diagnostics. (2008). *High Pure PCR Template Preparation Kit*. Alemania. Recuperado el 15 de Agosto de 2017, de http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia_ch/documents/broschueren/life_science/qPCR-NAP/Manual-NAPI/05204933001_EN_EA_High-Pure-PCR-Template-Preparation-Kit.pdf

Roche Diagnostics. (2017). *LightCycler® Master Mixes*. Recuperado el 14 de Septiembre de 2017, de <http://www.roche.com/about/business/diagnostics/about-diagnostics.htm>

Rodríguez-Herrera, R. (2009). *DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES*. Saltillo Coahuila-México.

- Sánchez, J. (2011). *Degradation of Aldrin by Bacillus licheniformis, Isolated from Water and Sediment from the Ciénaga Grande, Santa Marta, Colombia*. Santa Marta: Acta Biológica Colombiana.
- Sánchez-Yáñez, J. (2004). *Producción de bioinsecticida a base de Bacillus thuringiensis*. Michoacán-México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Sandoval, A. (2013). Extracción de ácidos nucleicos. En *Biología Molecular*. España: Interamericana Editores, S.A. .
- Shamala, T., Chandrashekar, A., Vijayendra, S., & Kshama, L. (2003). Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)- producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Applied Microbiology*.
- Solis, B. (17 de Junio de 2009). *Métodos Microbiológicos*. Recuperado el 16 de Septiembre de 2017, de <http://www.mailxmail.com/curso-productos-metodos-procesos-validacion/metodos-microbiologicos>
- Sosa López, A., & Pazos Álvarez, V. (Enero de 2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 8-10. Recuperado el 14 de Septiembre de 2017
- Stambouliau. (2010). Técnicas moleculares de Microbiología en la práctica diaria. *Bioanálisis*.
- Tamay de Dios, L., & Ibarra, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud*, 72-75.
- Tejera-Hernández, B. (2011). *Potencialidades del género Bacillus a la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos*. Revista

CENIC. Ciencias Biológicas. La Habana: Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

Torres, S., Pera, L., & Castro, G. R. (2004). Efecto de solventes orgánicos y estrés salino sobre el crecimiento, morfología y producción de esterasas de *B. licheniformis* S-86. *Simposio Internacional de Biotecnología. II Simposio Argentino-Italiano de Bacterias Lácticas*. San Miguel de Tucumán.

Tortoló-Cabañas, K., & Bell-García, A. (2015). Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*: estado del arte. *ICIDCA - Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 23.

UK Standards for Microbiology Investigations. (2015). Identification of *Bacillus* species. *Public Health England*, 11.

Vanrova, M., & Chaloupka, J. (1990). Temperature shiftup suppresses synthesis of extracellular proteins in *Bacillus megaterium*". *Curr. Microbiology*, 12, 9.

Vary, P. (1994). *Prime time for Bacillus megaterium*. Illinois: Great Britain.

Velasco, R. (2005). *MOLECULAR MARKERS AND THE DNA EXTRACTION*. Unicauca.

Vivas, M., & Martínez, M. (2008). Identificación y caracterización de una bacteria degradadora de parafinas. *Ciencia y Tecnología*, 56.

Waldeck, J., Daum, G., Bisping, B., & Meinhardt, F. (2006). Isolation and Molecular Characterization of Chitinase-Deficient *Bacillus licheniformis* Strains Capable of Deproteinization of Shrimp Shell Waste To Obtain Highly Viscous Chitin. *American Society for Microbiology*.

Williams, O. B., & Robertson, W. J. (1953). Effect of Temperature of Incubation at which Formed on Heat Resistance of Aerobic Thermophilic Spores. *udies on Heat Resistance*.

Yesid, A., & Sánchez, L. (2012). *Determinación de metabolitos secundarios a partir de Bacillus subtilis con efecto biocontrolador sobre Fusarium sp.* Bogotá-Colombia: Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.

Anexos

Anexo 1. Activación de cepas bacterianas

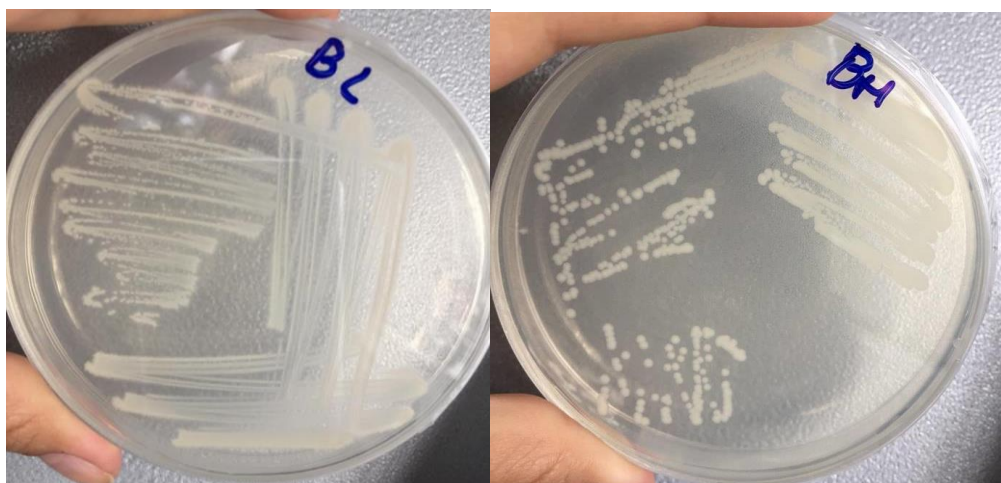
Anexo 1a.



Muestras crioconservadas en viales de Criobank.

Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 1b.



Resiembra de cepas BL y BM para observación macroscópica de la colonia, la forma y posterior análisis microscópico y tinciones.

Elaborado por: la autora, 2018.

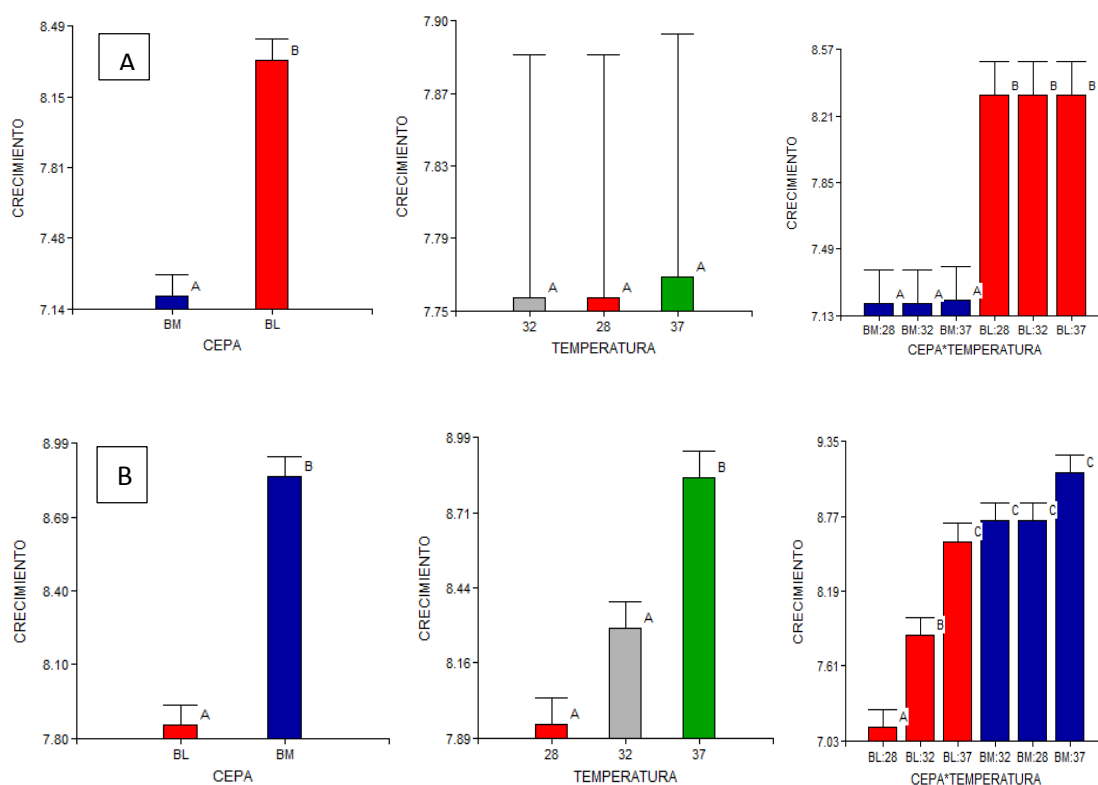
Anexo 2. Parámetros de programación del equipo LightCycler 2.0.

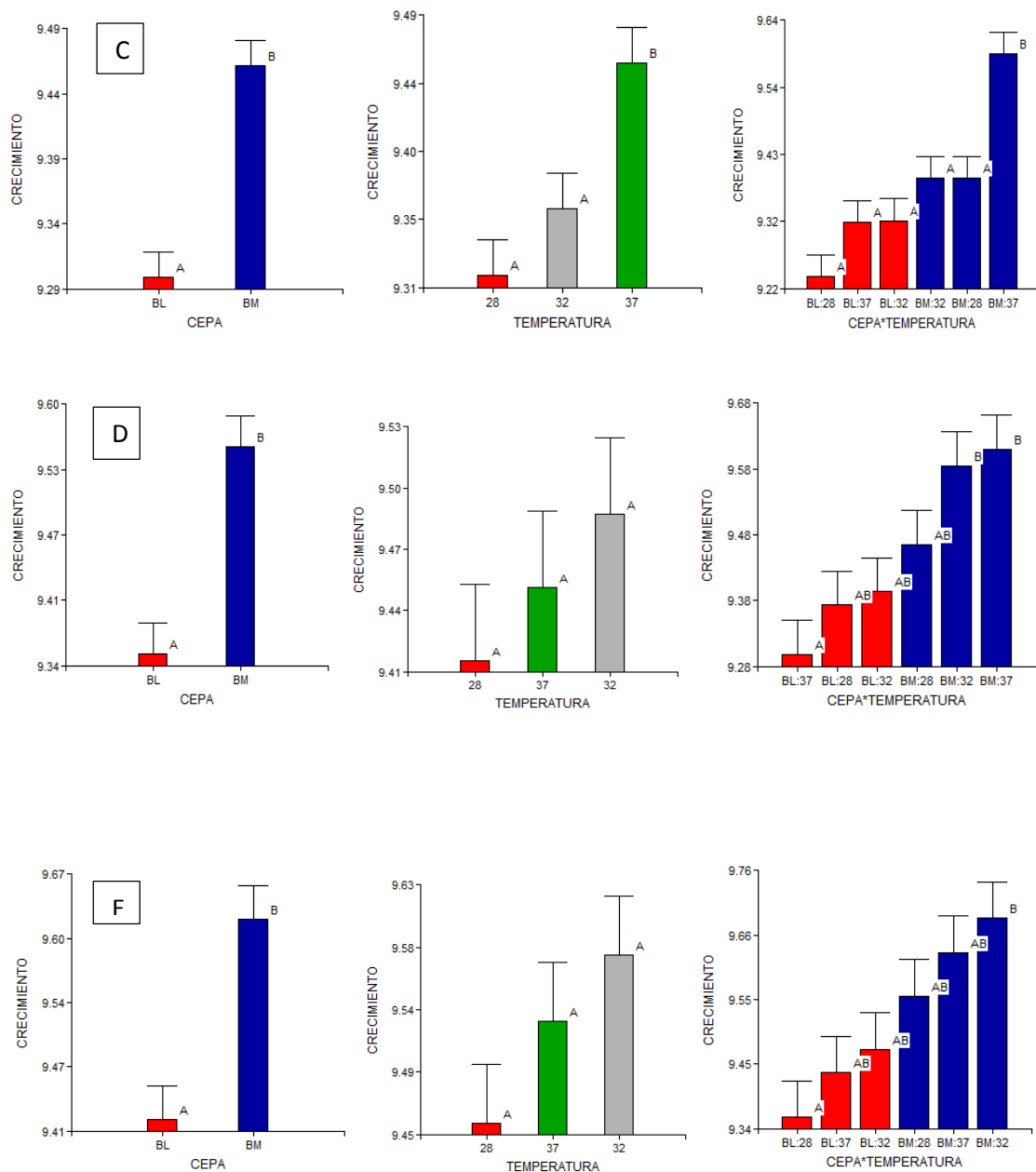
| Modo de análisis | Número de ciclo | Segmento | Temperatura objetivo (°C) | Tiempo de mantenimiento | Modo de Adquisición |
|-------------------|-----------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|
| Denaturación | 1 | | 95 | 10 min. | Ninguno |
| Ciclado | 35 | Denaturación | 95 | 10 seg. | Ninguno |
| | | Alineamiento (de cebadores) | 58 | 10 seg. | Ninguno |
| | | Extensión | 72 | 30 seg. | Simple |
| Curvas de melting | 1 | Denaturación | 95 | 0 | Ninguno |
| | | Alineamiento (de cebadores) | 65 | 60 | Ninguno |
| | | Melting | 95 | 0 | Continuo |
| Enfriamiento | 1 | | 40 | 30 | Ninguno |

Tomado de: (Chiluisa-Utreras & Echeverría, 2017) Modificado por la autora.

Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 3. Análisis factorial de Tukey 5% en datos de temperatura obtenida para BM y BL

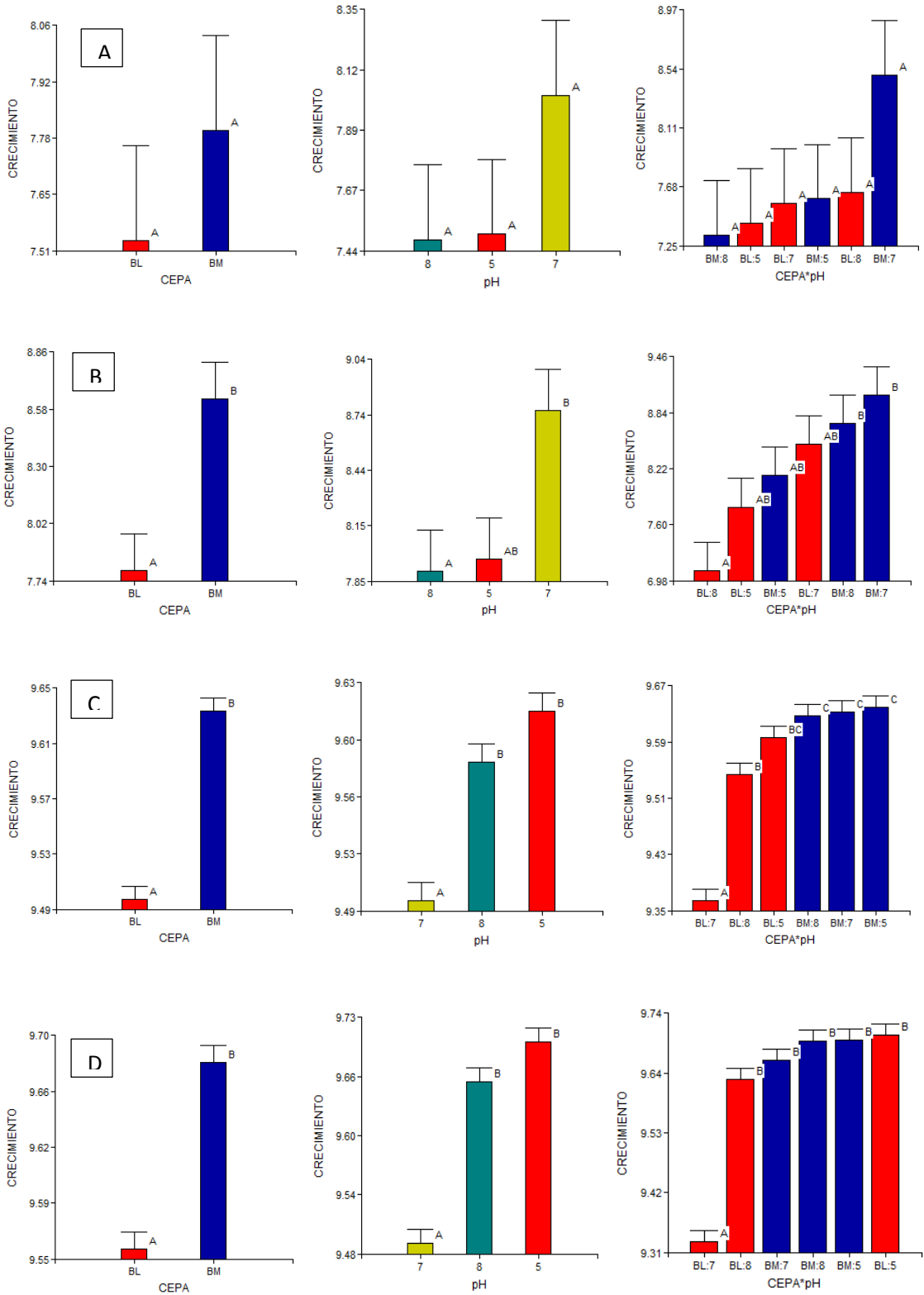


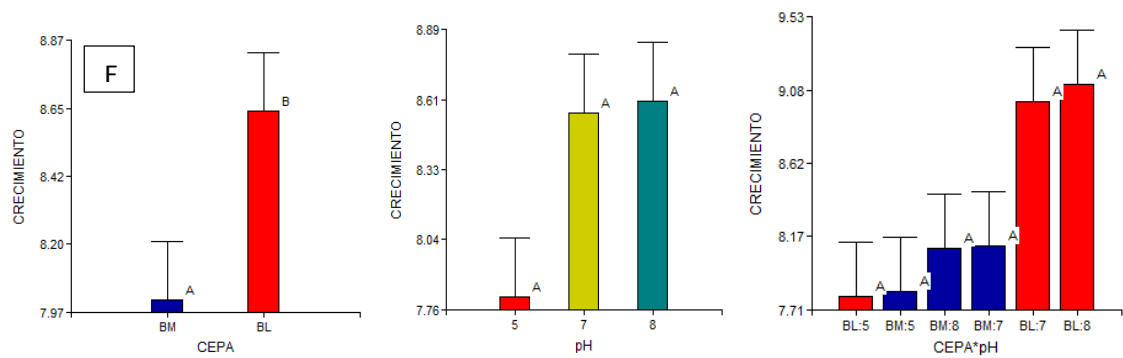


Diagramas de análisis de Tukey 5% . A) hora 0, B) hora 5, C) hora 24, D) hora 48, E) hora 72, para las cepas BM y BL.

Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 4. Análisis factorial de Tukey 5% en datos de pH obtenida para BM y BL

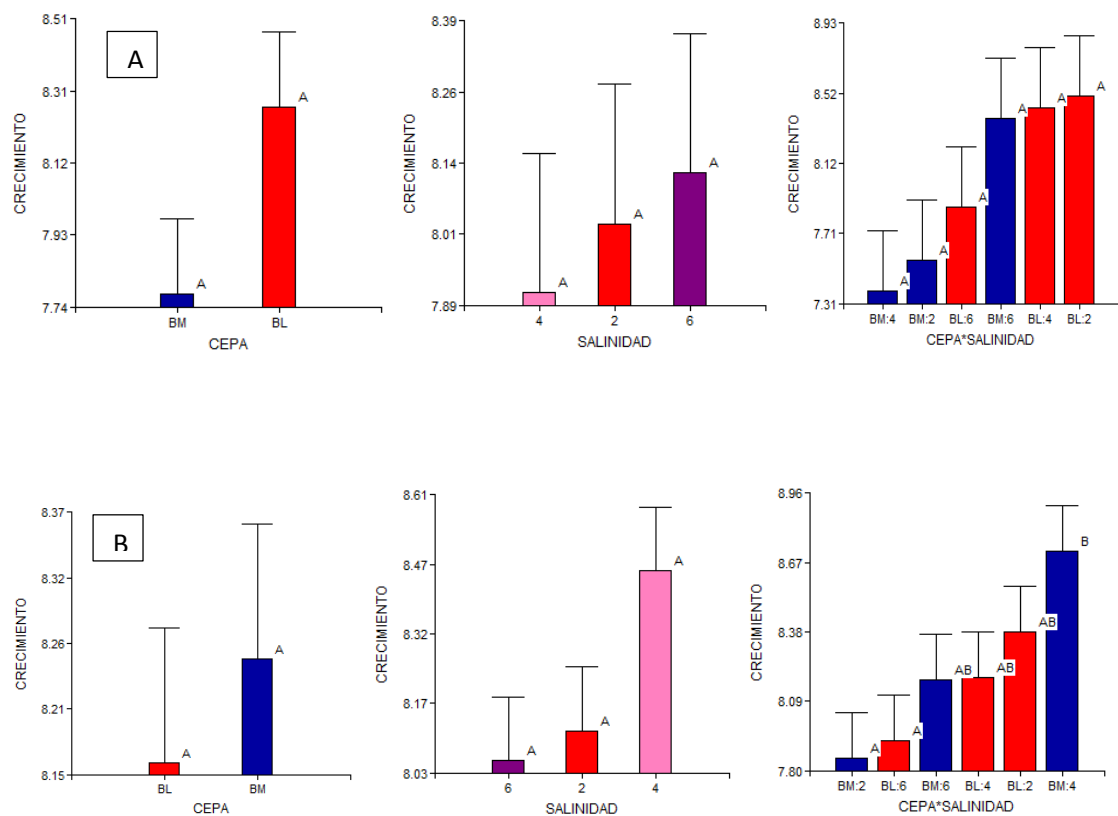


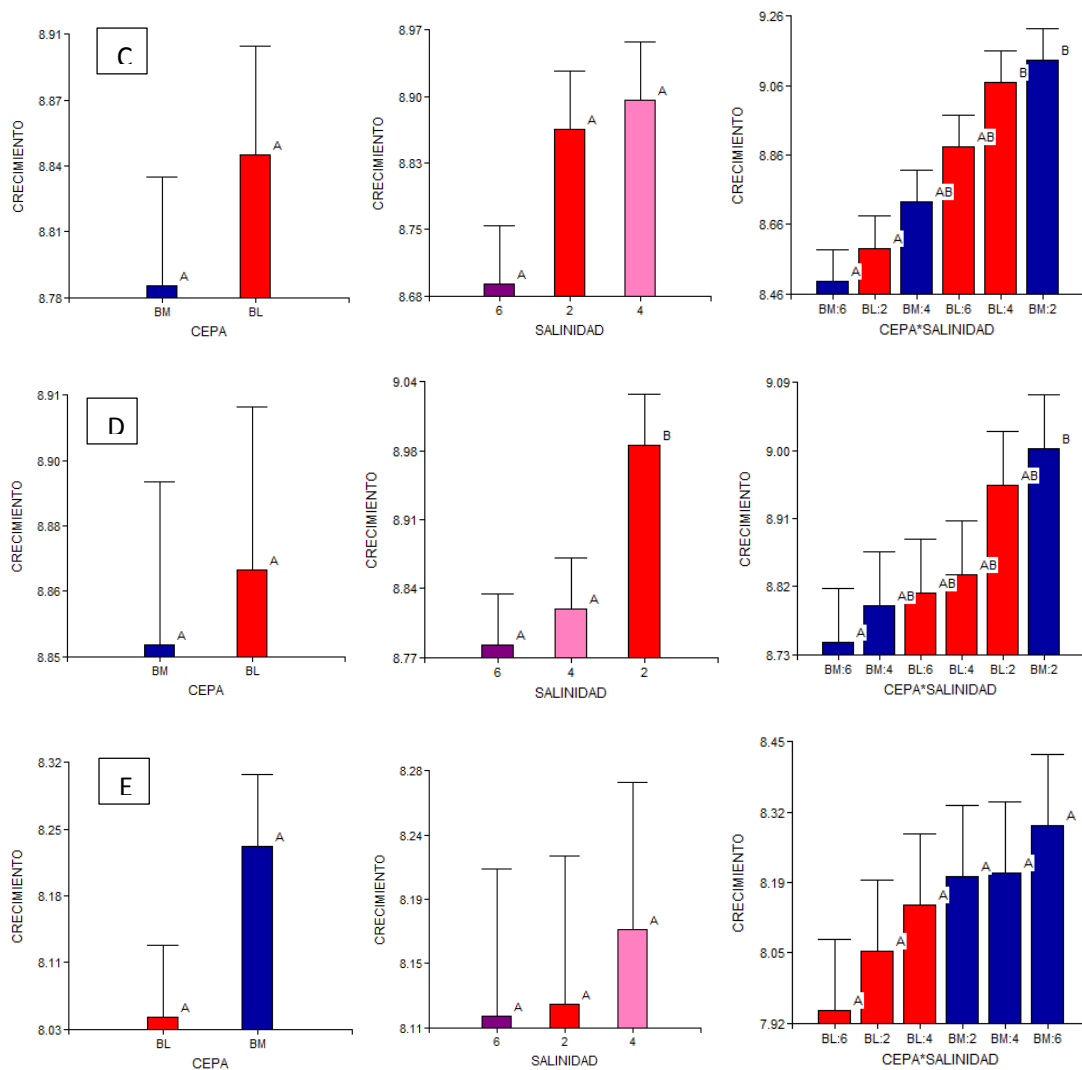


Diagramas de análisis de Tukey 5%. A) hora 0, B) hora 5, C) hora 24, D) hora 48, E) hora 72, para las cepas BM y BL.

Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 5. Análisis factorial de Tukey 5% en datos de salinidad obtenida para BM y BL

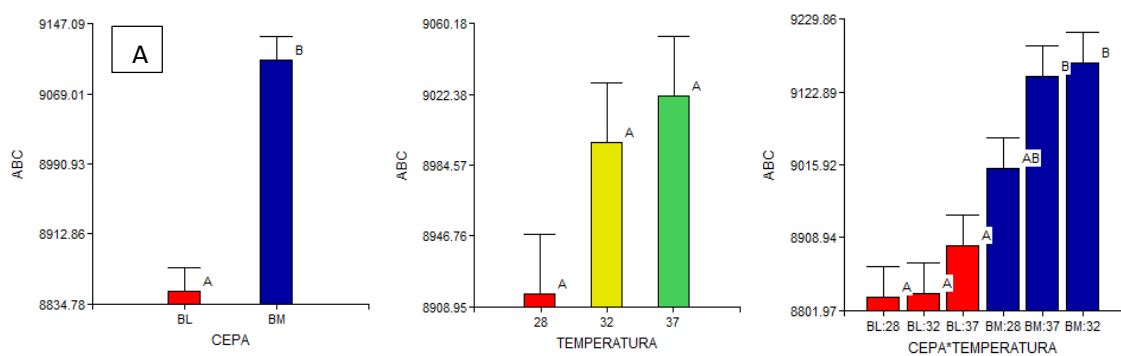


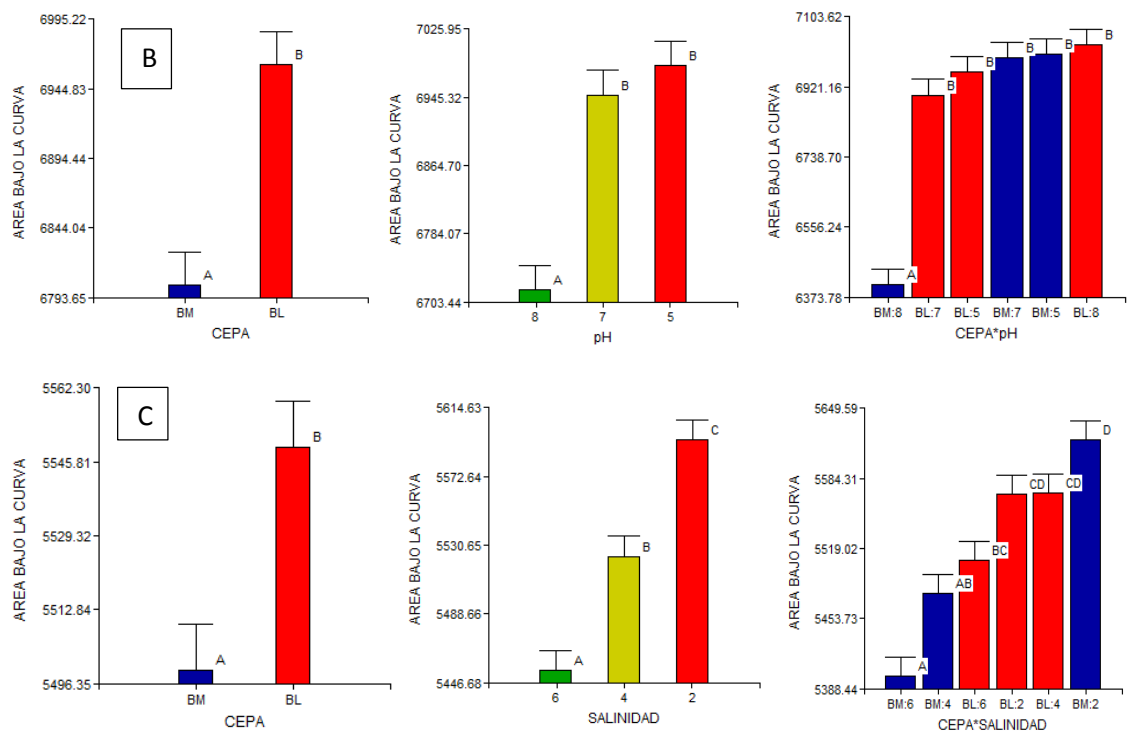


Diagramas de análisis de Tukey 5%. A) hora 0, B) hora 5, C) hora 24, D) hora 48, E) hora 72, para las cepas BM y BL.

Elaborado por: la autora, 2018.

Anexo 6. Área bajo la curva obtenida para BM y BL





Diagramas de análisis de Tukey 5%. A) Temperatura, B) pH, C) Salinidad, para las cepas BM y BL.

Elaborado por: la autora, 2018.